

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Markéta Koubovská**

Vliv věku ženy na míru DNA poškození v oocytech  
The effect of maternal age on the level of DNA damage in oocytes

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: doc. RNDr. Petr Šolc, Ph.D.

Praha, 2020

**Poděkování:**

Poděkovat bych chtěla zejména vedoucímu mé práce, doc. RNDr. Petru Šolcovi, Ph.D. za cenné rady, návrhy, připomínky a čas, který věnoval společným konzultacím a kontrolám textu. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Tomáši Ďuríčkově za ochotu a vysvětlení nejasností během pronikání do tématu a psaní práce.

Největší dík patří mé rodině, která mě po celou dobu studia plně podporuje a věří ve mě.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

*Část bakalářské práce byla publikována jako prvoautorská publikace.*

V Praze, 25. 5. 2020

Markéta Koubovská

## Abstrakt

Ženskými pohlavními buňkami jsou oocyty, jejichž množství je určující pro délku reprodukčního období. Důležitým faktorem, kromě množství, je také kvalita oocytů. Ta není po celý život stejná, s přibývajícím věkem dochází k jejímu snižování. Úbytek kvality je způsoben především hromaděním DNA poškození. Za nejzávažnější poškození jsou považovány dvouřetězcové zlomy (DSBs) kvůli přerušení obou řetězců DNA a následným možným translokacím či delecím. Dále však také mohou v buňce vznikat produkty působením volných kyslíkových radikálů, UV nebo γ záření, modifikované úseky DNA nebo chybně párující sekvence. Všechna tato poškození jsou reparačními mechanismy oocytu opravována. Čím je ale žena starší, dochází k poklesu exprese genů, které se těchto reparačních mechanismů účastní. Proto nejsou opravy dostatečně efektivní a všechna poškození nejsou odstraněna. S vyšším věkem ženy jsou rovněž spojeny neúspěšné pokusy o otěhotnění, vyšší rizika samovolného potratu nebo mimoděložní těhotenství. Aby se těmto rizikům, jež bezpochyby těhotenství ve vysokém věku představuje, předešlo a žena nebyla na životě ohrožena, došlo v evoluci k ztrátě reprodukční schopnosti. U člověka je ukončena kolem 50. roku života tzv. menopauzou.

### Klíčová slova:

Oocyt, DNA poškození, věk, neplodnost, odkládání mateřství

## Abstract

Female germ cells are oocytes, whose number defines the length of the reproductive period. Besides quantity the quality of oocytes is also an important factor. The quality is not the same throughout whole life, but it decreases with increasing age. The loss of quality is mainly due to the accumulation of DNA damage. The most serious damage is considered to be double-strand breaks (DSBs) because of both DNA strands break and subsequent translocation or deletion. There are also products caused by reactive oxygen species, UV or  $\gamma$  radiation, modified DNA section or mismatch sequence. All these lesions are repaired by oocyte repair mechanisms. However, the older a woman is, the more gene expression of DNA repair genes is decreased. That is why the repair is not efficient and DNA damage is not removed. Higher age is associated with unsuccessful attempts to conceive, a higher risk of miscarriage or an ectopic pregnancy. To avoid the risks that pregnancy in old age represents, the reproductive ability has been lost. In humans, it ends around the age of 50 with so-called menopause.

### Key words:

Oocyte, DNA damage, age, infertility, postponement of motherhood

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| Úvod .....   | 1  |
| 1. Oogeneze, folikulogeneze .....  | 2  |
| 1.1 Vznik primordiálního a primárního folikulu .....                                 | 2  |
| 1.2 Sekundární a antrální folikul.....   | 3  |
| 1.3 Stavba oocyty .....  | 4  |
| 1.4 První meiotický blok .....   | 5  |
| 1.5 Znovuzahájení meiózy a meiotická maturace .....                                  | 5  |
| 2. Poškození DNA .....   | 7  |
| 2.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS).....   | 8  |
| 2.2 Dvouřetězcové zlomy ( <i>double-strand breaks</i> , DSBs).....                   | 8  |
| 2.3 Další DNA poškození.....   | 9  |
| 3. Oprava DNA poškození.....   | 9  |
| 3.1 Oprava dvouřetězcových zlomů .....   | 10 |
| 3.1.1 Nehomologní spojování konců.....   | 11 |
| 3.1.2 Homologní rekombinace .....  | 13 |
| 3.2 Oprava dalších poškození.....  | 15 |
| 3.2.1 Nukleotidová excisní oprava .....  | 15 |
| 3.2.2 Bázová excisní oprava.....   | 16 |
| 3.2.3 Oprava chybného párování bází.....   | 17 |
| 3.3 Kontrolní body DNA poškození.....  | 17 |
| 3.3.1 G1/S kontrolní bod .....   | 18 |
| 3.3.2 G2/M kontrolní bod.....  | 18 |
| 4. Reakce oocytů na DNA poškození .....  | 19 |
| 4.1 Eliminace oocytů v primordiálních folikulech .....                               | 19 |
| 4.1.1 Meiotická rekombinace.....   | 19 |
| 4.1.2 Tap63 proapoptotická dráha .....   | 20 |
| 4.2 Metafáze/anafáze kontrolní bod ( <i>spindle assembly checkpoint</i> , SAC) ..... | 21 |
| 4.3 Oprava DNA poškození v zygotě.....   | 24 |
| 5. Reprodukční schopnost v průběhu života .....                                      | 25 |
| 5.1 Odkládání mateřství vs. plodnost ženy .....                                      | 25 |
| 5.2 Ztráta reprodukční schopnosti v průběhu evoluce .....                            | 26 |
| 5.3 Pokles účinnosti DNA reparace .....  | 27 |
| 5.3.1 Narůstající množství DNA poškození.....  | 27 |
| 5.3.2 Snížení exprese reparačních a dalších genů .....                               | 27 |
| Závěr.....   | 30 |
| Seznam zkratk.....   | 31 |
| Seznam použité literatury .....  | 33 |

## Úvod

Pohlavní ústrojí žen disponuje oocyty, které jsou uloženy ve vaječnících. Jejich množství je ale, na rozdíl od mužů, kteří mají reprodukční schopnost zachovanou po celý život, omezené. Množství oocytů, jež je ve vaječnících umístěno, jasně udává dobu, po kterou je žena plodná a je tedy schopná mít potomky. Toto období začíná v pubertě, kdy se poprvé objevuje menstruační cyklus. Samotný vývoj oocyty je však zahájen mnohem dříve, a to ještě v prenatálním období, kdy se zastavuje meiotické dělení v profázi I. Znovuzahájení meiózy nastává právě až s nástupem puberty.

Každá buňka, somatická i pohlavní, je ohrožována exogenními i endogenními vlivy, které představují potenciální hrozbu pro DNA, protože mohou indukovat vznik DNA poškození. Důraz je v této práci kladen zejména na vznik a působení dvouřetězcových zlomů a jejich následnou opravu. Ty se, kvůli možnému vzniku poškození dalších – např. delece, translokace, považují za ty nejvíce škodlivé.

Zároveň je tato práce zaměřena na popis trendu, jež se objevuje až v poslední době, a to konkrétně na posouvání mateřství žen. Tento jev se stává větším problémem, který se ještě minulých generací nedotýkal a který tito lidé nemuseli zdaleka tolik řešit. Ženy ve vyšším věku, usilující o potomka tak mohou narazit na opakované neúspěšné pokusy o otěhotnění. Je zde však také zvětšující se riziko spontánních potratů, mimoděložních těhotenství nebo narození mrtvého potomka. Jedním z důvodů, proč se ženám ve vyšším věku nedaří otěhotnět, je snížená schopnost oocytů reparovat DNA poškození. DNA poškození v oocyty sice vznikají po celý život, ale jsou opravována. Se vzrůstajícím věkem ženy však klesá exprese genů účastníků se DNA oprav, a proto nejsou reparační mechanismy natolik účinné.

Cílem práce je shrnout vývoj oocyty ve folikulu v průběhu života ženy, vznik DNA poškození a reparační mechanismy, jež jsou buňkou využívány. Dále způsob, jakým na poškození reagují oocyty a také zygota. Práce se snaží rovněž vysvětlit, proč u žen v evoluci došlo ke ztrátě reprodukční schopnosti a jaké mohou být motivy žen k častěji se objevujícím odloženým pokusům o otěhotnění.

# 1. Oogeneze, folikulogeneze

Pojem oogeneze představuje proces, který má zásadní roli v reprodukčním úspěchu živočichů. Zahrnuje vznik, růst a dozrávání oocyty, unikátní buňky, která je významná svou schopností vytvořit novou generaci organismu. Oocyt po splnutí se spermií dá vzniknout celé linii buněk, které tvoří embryo (Rodrigues et al., 2008).

Během vývoje vaječníků se uplatňují nejen samotné oocyty, ale také další typy buněk, např. buňky granulózní nebo thekální. Ty se podílejí na struktuře a zajištění funkcí nezbytných pro reprodukci. Průběh vývoje se dá rozdělit do 2 hlavních fází, a to nejprve samotný vznik vaječníku a zakládání skupiny primordiálních folikulů, odehrávající se zejména během prenatalního vývoje. Jako druhá fáze se označuje maturace folikulů, tj. přeměna na folikuly primární, sekundární a antrální, a následné vypuštění oocyty, který je schopný oplození, ven z vaječníku (Wear et al., 2016). Vývoj folikulu je až do stádia sekundárního folikulu nezávislý na gonadotropinech, proto k jeho růstu dochází i před dosažením pohlavní dospělosti, obdobím puberty (Jones & Shikanov, 2019).

Vaječníky, samičí pohlavní orgány, jsou zdrojem pohlavních buněk, oocytů (D. Zhang et al., 2015). Ke vzniku prekursorů zárodečných buněk dochází z extraembryonálního mesodermu posteriorně od budoucí gonády (Wear et al., 2016). Musí proto dojít k migraci těchto primordiálních zárodečných buněk (obr. 1A) přes zadní střevo až do genitální lišty (Ginsburg et al., 1990). Poté, co buňky dorazí do genitální lišty, diferencují a zapínají se geny specifické pro dané pohlaví. To, v jaké pohlaví se buňky vyvinou, je dáno sexuální povahou gonády, nikoli buňkami samotnými (Gill et al., 2011). U samičího pohlaví probíhá diferenciace v oögonie, u kterých nedochází při mitotickém dělení k úplné cytokinezi, díky čemuž mezi jednotlivými buňkami vznikají spojení, můstky. Takto vzájemně propojeným buňkám se říká cysty, klastry (Pepling & Spradling, 1998). Buňky, které jsou takto uspořádány do cyst, vstupují do profáze I, kde se zastavují v diplotene a k znovuzahájení meiózy dochází až po dosažení pohlavní zralosti. V době, kdy jsou oocyty zadrženy v diktyotenním stádiu, nastává rozpad jednotlivých cyst do samostatných buněk a následuje jejich masivní odumírání. Celkový úbytek buněk může být až 66 % (u myšího modelu – počáteční množství 6000 buněk vs zbylých 2000 po apoptóze). Předpokládá se, že k tomuto jevu dochází proto, aby se odstranily zejména buňky mající např. chromosomové aberace nebo defekty mitochondriálního genomu (Pepling & Spradling, 2001).

## 1.1 Vznik primordiálního a primárního folikulu

Neprodleně po tomto úbytku buněk dochází k vytvoření primordiálních folikulů (obr. 1B). Primordiální folikuly jsou základní strukturou samičích pohlavních orgánů a jejich množství je určující pro délku reprodukčního období (Fulton et al., 2005). Skládají se ze samotného oocyty, který je dále obklopen jednou vrstvou plochých granulózních buněk. Takové folikuly bývají často označovány jako

folikuly klidové, odkazující na to, že zůstávají v nezměněné podobě i v řádu let (Braw-Tal, 2002). Změnou tvaru granulózních buněk z plochých na tvar kvádry (kuboidální buňky) a vytvořením souvislé vrstvy buněk kolem oocyty se z primordiálního folikulu stává primární folikul (obr. 1C). Následuje nárůst v počtu granulózních buněk, který je doprovázen rapidním zvětšením velikosti oocyty. Ukázalo se, že předpokladem pro počátek růstu oocyty je přítomnost kuboidálních granulózních buněk. Při experimentu na hovězích oocytech bylo zjištěno, že při měření průměru oocyty došlo ke změně až ve chvíli, kdy počet kuboidálních granulózních buněk přesáhl v největším možném průřezu hodnotu 40. Do té doby se velikost oocyty neměnila (Braw-Tal & Yossefi, 1997).

Oocyt má na počáteční růst folikulu velký vliv. Oocyt produkuje dva růstové faktory: růstový diferenciační faktor 9 (*growth differentiation factor*, GDF9) a kostní morfogenetický protein 15 (*bone morphogenetic protein 15*, BMP15). Oba tyto faktory se řadí do rodiny transformujících růstových faktorů  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ ) a jsou nezbytné pro proliferaci granulózních buněk (Braw-Tal, 2002). U GDF-9 deficientních myší se prokázalo, že sice dojde k vytvoření folikulů s jednou vrstvou buněk, ale dále se vývoj zastavuje, není přítomen žádný folikul s dvěma a více vrstvami (Dong et al., 1996).

## 1.2 Sekundární a antrální folikul

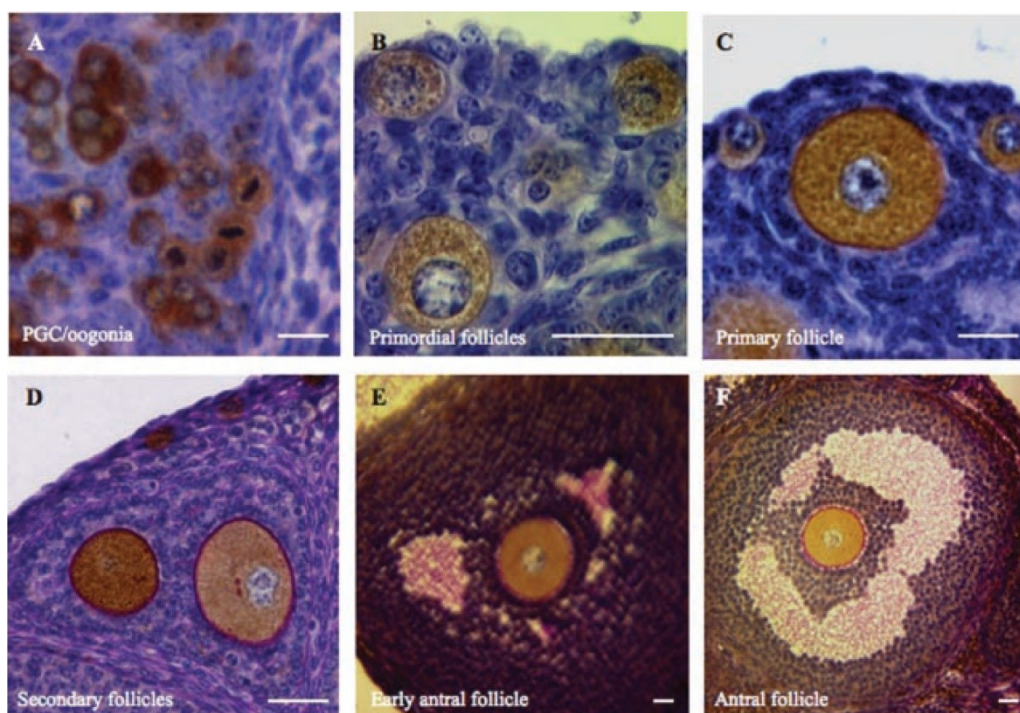
Jako sekundární folikul lze nazvat takový folikul, ve kterém je oocyt obklopen více než jednou vrstvou granulózních buněk (obr. 1D)(Eppig, 2001). Ve chvíli, kdy se kolem oocyty naakumuluje dostatečné množství buněk a vytvoří se mnohvrstevná struktura, nahromadí se tekutina v mezibuněčném prostoru tak, až začnou vznikat malé dutinky napříč vrstvami (obr. 1E). Ty postupně splývají, až vytvoří jednu velkou dutinu naplněnou tekutinou neboli antrum. Od toho momentu se také folikul nazývá antrální (obr. 1F)(Buccione et al., 1990; Rodrigues et al., 2008). Granulózní buňky se v takovém folikulu dělí na 2 skupiny podle jejich lokalizace. Každá ze skupin má odlišnou funkci, a proto mají i odlišnou genovou expresi. Granulózní buňky lemující stěnu folikulu se označují jako nástěnné (murální granulózní buňky), zatímco buňky obklopující oocyt se nazývají kumulární (Eppig et al., 2002). Opět zde platí, že buňky obou typů navyšují svůj počet souběžně s tím se zvětšuje velikost oocyty (Munakata et al., 2016).

Vývoj antrálních folikulů je závislý na gonadotropinech, konkrétně především na folikulostimulačním hormonu (FSH) a luteinizačním hormonu (LH), (Eppig, 2001) na rozdíl od předcházejících vývojových stupňů folikulů. Na přechodu mezi sekundárním a antrálním folikulem dochází k vytvoření vrstvy thekálních buněk, které se připojují na membránu folikulu. Tyto buňky mají velmi plochý a protáhlý charakter (Braw-Tal & Yossefi, 1997). Antrální folikul v pokročilejším stádiu vývoje se také často označuje jako Graafův folikul (Eppig, 2001).



### 1.3 Stavba oocyty

Kumulární buňky, diferencující se v antrálním folikulu od těch nástěnných a obklopující oocyt, hrají důležitou roli při jeho vývoji (Cetica et al., 2002). Společně s oocytem vytváří oocyt-kumulární komplex. Jejich úlohou je zprostředkovávat buněčné interakce a zajišťovat optimální prostředí pro růst a maturaci oocyty. Mezi buňkami a oocytem dochází k výměně signálních látek a obousměrnému toku metabolitů, což je zásadní pro získání oocyty kompetentního k znovuzahájení meiózy a následnému oplození (Tahajjodi et al., 2020). Výměna metabolitů probíhá skrze *gap junctions*. Tyto mezibuněčné spoje se objevují v rané folikulogenezi, ještě předtím, než se vytvoří *zona pellucida* (Anderson & Albertini, 1976). *Zona pellucida* je glykoproteinový obal oocyty a u člověka, stejně jako u myši, dochází k jejímu vzniku v sekundárním folikulu. *Gap junctions* se skládají z 6 proteinových podjednotek, čímž vytvoří kanálek, konexon. Konexon jedné buňky se spojí s konexonem buňky druhé, a tím vzniká *gap junction*. Tyto spoje jsou velmi důležité. Pokud chybí například jedna z jejich proteinových podjednotek, nedojde vůbec ke znovuzahájení meiózy. Jiné mutace mohou být dokonce letální (Braw-Tal & Yossefi, 1997; Rodrigues et al., 2008).



Obr. 1: Jednotlivá stádia růstu folikulu a oocyty. A) primordiální kmenové buňky; B) primordiální folikul; C) primární folikul; D) sekundární folikul; E) raně antrální folikul; F) antrální folikul. Převzato z (Rodrigues et al., 2008)

## 1.4 První meiotický blok

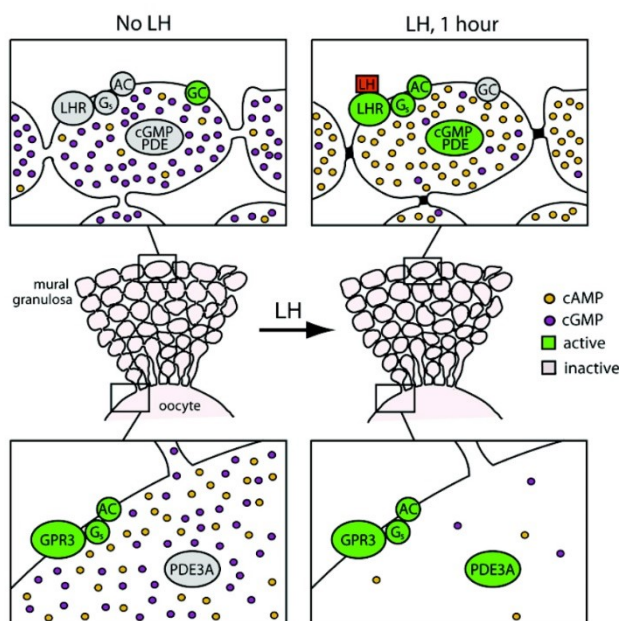
Jak již bylo řečeno, oocyty vstupují do prvního meiotického dělení již během prenatálního období a jsou zastaveny v diktyotenním stádiu do doby, než dojde k znovuzahájení meiózy a ovulaci, nebo je oocyt nucen podstoupit atrézii, tedy zánik (Fair et al., 1995). Zastavení meiotického dělení v profázi I je zajišťováno granulózními buňkami. Tyto buňky jsou primárním zdrojem signálů inhibujících spuštění meiózy. Důkazem pro to je experiment prováděný na myších, ve kterém, poté, co se oocyt spolu s kumulárními buňkami odstraní z folikulu, nastalo samovolné spuštění meiotického dělení. Jednou ze signálních molekul udržujících meiotický blok je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Norris et al., 2009). Celý proces je založen na fosforylaci klíčových proteinů regulujících buněčný cyklus. Vysoká hladina cAMP aktivuje protein kinázu A (PKA), která dále fosforyluje WEE1B kinázu a CDC25B fosfatázu. Fosforylace WEE1B má aktivační účinek, zatímco fosforylace CDC25B má účinek inhibiční. Aktivovaná WEE1B fosforyluje, a tím inhibuje cyklin-dependentní kinázu 1 (CDK1) na pozicích Thr14 a Tyr15. CDK1 ke své aktivitě potřebuje i vazbu cyklinu B. CDC25B, která je inhibovaná, nemůže CDK1 defosforylovat a tím aktivovat, čímž je udržován meiotický blok (Pirino et al., 2009).

Společně s cAMP se na udržování meiotického bloku podílí cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Ten se ze somatických buněk do oocyty dostává přes *gap junctions* (obr. 2). Jeho hlavní úlohou v této situaci je inhibice cAMP fosfodiesterázy 3 (PDE3A) (Norris et al., 2009). PDE3A je enzym, který má za úkol hydrolyzovat esterovou vazbu cAMP, a tím tento nukleotid rozkládat (Masciarelli et al., 2004). Pokud se do oocyty transportuje cGMP a inhibuje PDE3A, zamezí se tím snížení hladiny cAMP, nebude tedy hydrolyzováno a díky tomu bude pokračovat blokování znovuzahájení meiózy (Norris et al., 2009).

Myší samice, které měly inaktivovaný gen pro PDE3A sice nevykazovaly žádný viditelný rozdíl při svém růstu oproti myším kontrolním, ale všechny byly sterilní. Jejich oocyty totiž zůstaly během vývoje zastavené v diktyotenním stádiu (Masciarelli et al., 2004). Aby ale mohlo dojít k znovuzahájení meiózy, musí folikul nejprve dosáhnout určité velikosti, tj. musí se stát antrálním (Rodrigues et al., 2008). Většina antrálních oocytů je tzv. meioticky kompetentní a pokud se odstraní z folikulu, spustí se spontánně meióza. Jako meioticky nekompetentní označujeme takové oocyty, které nemají vytvořené antrum a nejsou schopné znovuzahájení meiózy (Eppig, 2001).

## 1.5 Znovuzahájení meiózy a meiotická maturace

Základem pro znovuzahájení meiózy je zvýšení hladiny LH. Receptory pro tento hormon jsou přítomné na nástěnných buňkách, stejně tak na buňkách thekálních, avšak nikoli na buňkách kumulárních nebo na samotném oocyty. Po navázání hormonu na receptor dojde ke zvýšení množství cAMP v granulózních buňkách, což vede k zavření *gap junctions* mezi jednotlivými buňkami. Vazbou LH



Obr. 2: Udržování oocyty v meiotickém bloku, bez LH (vlevo); po vlně LH, obnovení meiotického dělení (vpravo). Převzato z (Norris et al., 2009)

Snížením hladiny cAMP v oocyту nedochází k pokračování stimulace aktivity PKA, která kvůli tomu nemůže fosforylovat své substráty, WEE1B a CDC25B. CDC25B se, již v nefosforylovaném stavu, stává aktivní, translokuje se do jádra, a může aktivovat CDK1 tím, že CDK1 díky své duální specifitě defosforyluje Thr14 a Tyr15. Myši, kterým chybí Cdc25B, jsou sterilní, protože jejich oocyty zůstávají v diktyotenním stádiu, nedojde k aktivaci CDK1 a k znovuzahájení meiózy (Pirino et al., 2009).

To, jak je LH v této fázi klíčový, je evidentní z experimentu, ve kterém byly pozorovány myši s mutovanou  $\beta$ -podjednotkou LH hormonu, a u kterých nedošlo k vyvinutí folikulů do antrálního stádia. Kvůli tomu u nich pak nenastala ovulace (X. Ma et al., 2004). Ještě předtím, než dojde k ovulaci, musí kumulární buňky podstoupit proces expanze, tzv. mucifikace. Jedná se o syntézu a sekreci kyseliny hyaluronové kumulárními buňkami (Eppig et al., 2002). Pokud by například došlo k inhibici její syntézy, snížila by se míra ovulace (Eppig, 2001).

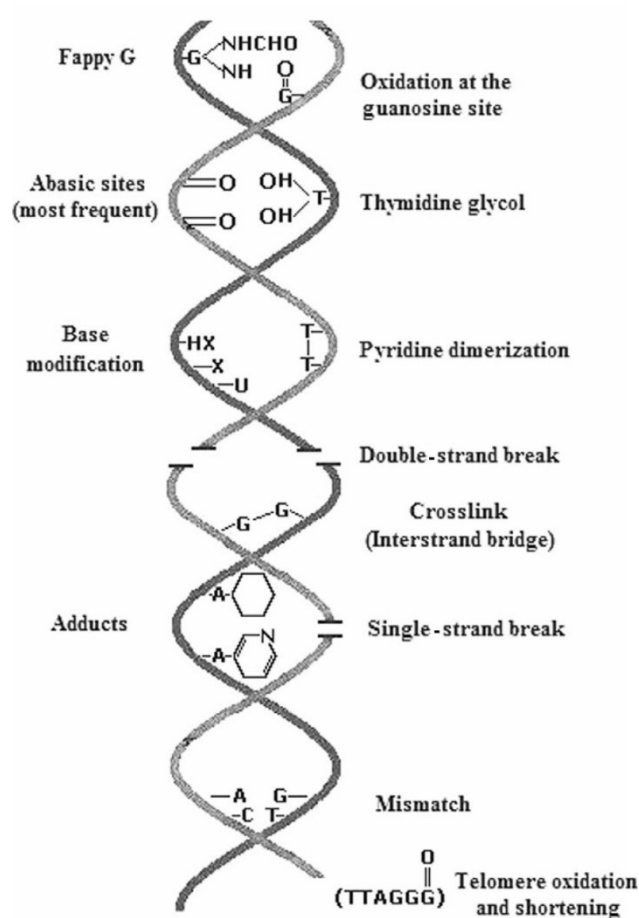
V počátku znovuzahájení meiózy nastává rozpad jaderné membrány (*germinal vesical breakdown*, GVBD)(Buccione et al., 1990). V této fázi se jádro oocyty nazývá zárodečný váček, (*germinal vesical*, GV)(Rodrigues et al., 2008). Oocyt dále pokračuje v prvním meiotickém dělení, při kterém dochází k segregaci homologních chromosomů. Výsledkem je vydělení prvního pólového tělíska (Masciarelli et al., 2004). Následuje druhé meiotické dělení, ve kterém již segregují sesterské

chromatidy. Toto dělení je ale zastaveno v metafázi II a nastává druhý meiotický blok (Rodrigues et al., 2008). Takový oocyt je kompetentní k oplození spermií (Masciarelli et al., 2004). Poté, co je vytvořeno první pólové tělísko, je u většiny savců oocyt vypuštěn ven z vaječníku (Pincus & Enzmann, 1935). Tento okamžik, uvolnění zralého, oplození schopného oocyta z vaječníku, se označuje jako ovulace. Nástěnné granulózní buňky, které po ovulaci zůstávají ve vaječníku, dále diferencují a spolu s thekálními buňkami tvoří žluté tělísko, corpus luteum (Eppig, 2001).

## 2. Poškození DNA

Molekula DNA je poměrně nestabilní. Bylo například spočítáno, že každý den člověk ztratí během spontánní depurace tisíce purinů (Nospikel, 2007). Genom všech žijících organismů na Zemi je tedy po celou dobu jejich života v dynamické rovnováze mezi vznikajícím poškozením DNA a mechanismy, které se snaží toto poškození opravit (Araújo & Kuraoka, 2019). DNA je zároveň ohrožována vnějšími vlivy. Mezi exogenní činitele, které vytvářejí DNA poškození, patří například ultrafialové (UV) (Nospikel, 2007) nebo ionizační záření (γ nebo rentgenové paprsky) (Hartlerode & Scully, 2009), znečištění v atmosféře nebo cigaretový kouř či některé chemické složky obsažené v potravě (Nospikel, 2007). Poškození, která vznikají, mohou způsobovat například změny v genové expresi, dědičné i nedědičné mutace, smrt buněk, dále také reprodukční selhání nebo vznik život ohrožujících nemocí. Dojde-li k poškození DNA samčích či samičích pohlavních buněk, může to vést k potratům nebo se u narozených potomků mohou objevit vrozené anomálie nebo nižší porodní váha (Ozturk & Demir, 2011).

Při studiu myších oocytů po ozáření DNA vznikaly chromosomové aberace, translokace či zlomy (Tease, 1983).



Obr. 3: Přehled nejdůležitějších DNA poškození. Převzato z (Ménézo et al., 2010)

## 2.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS jsou molekuly, které vznikají neúplnou redukcí atomů kyslíku a které mohou reagovat s biomolekulami, např. proteiny nebo DNA (García-Rodríguez et al., 2018). V mitochondriích, v elektron-transportním řetězci, dochází v malé míře k přeměně molekul kyslíku na superoxidový radikál, který je přeměněn na peroxid vodíku (Winship et al., 2018). Vychytávače volných radikálů a antioxidanty jsou proteiny, jejichž funkcí je minimalizovat stres z ROS (Ozturk & Demir, 2011).

Když produkce ROS významně převyší množství, které je obranný systém antioxidantů schopný odstranit, může dojít k inhibici některých enzymů v důsledku jejich oxidace, peroxidaci lipidů nebo poškození DNA (García-Rodríguez et al., 2018). Např. po peroxidaci lipidů mohou být některé ze vzniklých produktů připojeny na DNA za vzniku DNA aduktů. ROS také mohou indukovat deaminaci bází – konkrétně deaminaci cytosinu na uracil (Ménézo et al., 2010) či vznik jednořetězcových zlomů (*single-strand breaks*, SSBs)(obr. 3)(Winship et al., 2018).

Ze základních čtyř bází, které DNA tvoří, je guanin nejvíce náchylný a citlivý na oxidaci. Nejběžnější oxidovaná forma guaninu je 8-oxoguanin (8-oxoG). V DNA způsobuje během replikace transverzi, kdy místo obvyklého Watson-crickovského párování dochází k párování guaninu (G) s adeninem (A). V buňkách zárodečné linie je, zejména kvůli těmto změnám, příčinou vzniku dědičných mutací. Tato forma tedy hraje velkou roli v mutagenезi a karcinogenезi, a vyskytuje se ve velkém množství např. v mozkových buňkách pacientů s Alzheimerovou nebo Parkinsonovou chorobou (García-Rodríguez et al., 2018; Araújo & Kuraoka, 2019).

Na ROS se však nelze dívat ve vztahu k organismu jen negativně, v nízkých koncentracích jsou totiž velmi potřebné pro správné fyziologické fungování, například při folikulogenезi, maturaci oocyty, ovulaci nebo pro vznik žlutého tělíska (García-Rodríguez et al., 2018).

## 2.2 Dvouřetězcové zlomy (*double-strand breaks*, DSBs)

DSBs jsou léze vznikající v okamžiku přerušení obou antiparalelních řetězců DNA naproti sobě nebo ve své blízkosti (Chapman et al., 2012). Jsou považovány za nejvíce škodlivé kvůli možnému vzniku delecí, translokací nebo inverzí – tedy možná ztráta či přeskupení části genomu, a proto pro buňku představují největší hrozbu. Mohou vznikat na základě působení exogenních i endogenních vlivů. Mezi nejvýraznější endogenní vlivy řadíme kolaps replikační vidličky, V(D)J rekombinaci receptorů T lymfocytů, (Rothkamm et al., 2003) nebo meiotickou rekombinaci během prenatalního vývoje (García-Rodríguez et al., 2018). Je důležité si uvědomit, že také dochází ke vzniku DSBs ze SSBs. Nejprve dojde k produkci jednořetězcových lézí, ať už zlomů nebo např. AP míst, a následné konverzi na DSBs během S fáze buněčného cyklu. Zároveň, jsou-li SSBs velmi blízko sebe, je toto místo méně odolné vůči pnutí a může dojít k vytvoření DSB rovnou (Vilenchik & Knudson, 2003; Mahaney et al.,



2009). Pokud nejsou DSBs opravené, mohou vést ke ztrátě genetické informace, zastavení buněčného cyklu či apoptóze (Rothkamm et al., 2003).

Kvantifikace DSBs se provádí např. pomocí detekce varianty histonu H2AX fosforylované na pozici Ser139 ( $\gamma$ -H2AX). K této fosforylaci dochází v okolí DSB jako součást buněčné odpovědi na vznik DSBs.  $\gamma$ -H2AX signalizuje místo poškození označením nukleosomů v rozsahu jedné nebo více megabází obklopující zlom. Proto je tento histon naprosto klíčový v propojení místa poškození s proteiny účastníky se opravy. Místa, kde můžeme po označení detekovat fosforylovanou formu, označujeme jako „ $\gamma$ -H2AX foci“ (Chapman et al., 2012).

## 2.3 Další DNA poškození

Kromě DSBs se mezi DNA poškození řadí již zmiňované SSBs. Ty vznikají při poškození pouze jednoho vlákna DNA. Ačkoli jsou ve srovnání s DSBs méně nebezpečné, jejich rychlá a efektivní oprava je velice důležitá právě proto, aby se předešlo vzniku DSBs. Při jejich opravě je použito druhé, komplementární vlákno DNA, které je nepoškozené a slouží tedy jako templát (Ménéz et al., 2010). Tento způsob oprav je, zejména kvůli použití templátu, z velké většiny bezchybný. Může se ale stát, že SSB není reparačním systémem opraven a v důsledku toho poté dochází k zastavení replikace a ke kolapsu replikační vidličky (Vilenchik & Knudson, 2003).

## 3. Oprava DNA poškození

Stabilita a integrita DNA jsou jedny ze zásadních předpokladů pro životaschopnost buněk. Toto tvrzení platí o to více u buněk samičí zárodečné linie, kde to, jak stabilní DNA je, je klíčové pro správnou maturaci oocyty, úspěšné početí, těhotenství, správný embryonální vývoj a porozením zdravého potomka. Nesprávně opravená nebo neopravená poškození mohou vést ve vzniku vývojových vad či potratům (Martin et al., 2019; Leem et al., 2019).

Pokud se tedy v buňce, ať už somatické nebo pohlavní, objeví DNA poškození, má tato buňka tři možnosti, jak se s daným poškozením vypořádat. První možností je – a to zejména u rozsáhlejších škod DNA – aktivovat apoptotickou dráhu a podstoupit buněčnou smrt. V buňce probíhá exprese pro-apoptotických (např. Bax, Bak) a anti-apoptotických (Bcl2) genů a osud buňky je dán převahou exprese jedné ze skupin genů. Druhou možností je léze ignorovat a jejich přítomnost tolerovat. Volba této dráhy vede ke zvýšené pravděpodobnosti vzniku mutací a karcinogenezi. Třetí možností je, aby se buňka pokusila poškození opravit. DNA reparační aktivita je soubor procesů, během kterých buňka rozpoznává a následně opravuje poškozenou molekulu DNA (Ménéz et al., 2010).

V případě, že dojde k identifikaci DNA poškození, je buňka schopná aktivovat kontrolní body vedoucí k zastavení buněčného cyklu, tak aby měla dostatek času na opravu (Winship et al., 2018). Tyto kontrolní body operují na přechodu mezi G1/S a G2/M fázemi tak, aby poškození bylo opraveno před syntézou DNA a rozdělením do dceřiných buněk (viz kapitola 3.3)(Ozturk & Demir, 2011).

Zejména zásadní je oprava DNA poškození v oocytech. Oocyty savců jsou obzvláště zranitelné a citlivé na poškození, protože – vztaženo vzhledem k člověku – mohou některé z nich zůstat v klidovém stavu i více než 40 let, do doby, než nedostanou stimul k opětovnému růstu a znovuzahájení meiózy a nenabydou schopnosti kompetence k oplození. Jejich detekce a následná oprava poškození tedy musí být zvláště efektivní tak, aby se ve vaječníku uchoval dostatek oocytů na celé reprodukční období a jednotlivé oocyty byly kvalitní natolik, aby mohly být oplozené spermií (Carroll & Marangos, 2013). Jak jsou geny pro reparaci DNA poškození opravdu důležité, ukazuje studie, ve které byla stanovována genová exprese v oocytu, embryonálních stádiích jedné, dvou a osmi buněk a v blastocystě. Bylo zjištěno, že geny pro odpověď na DNA poškození a reparační geny jsou v oocytu nadměrně zastoupeny. Díky tomu může oocyt efektivně zachovávat genomovou integritu, jak je potřeba (Zeng et al., 2004).

### 3.1 Oprava dvouřetězcových zlomů

Jednou z prvních odpovědí buňky jako reakce na vznik DSBs je vazba MRN komplexu (sestavující ze tří proteinů – MRE11, RAD50 a NBS1) do místa zlomu (J. Y. Ma et al., 2019). Tento komplex slouží jako prvotní senzor, díky kterému se dále do místa poškození rekrutuje, a tím aktivuje, ATM kináza. ATM fosforyluje řadu cílů (Martin et al., 2019), např. již zmiňovaný histon H2AX na pozici Ser139 za získání  $\gamma$ -H2AX histonu (Vilenchik & Knudson, 2003). Odhaduje se, že každý  $\gamma$ -H2AX focus reprezentuje jeden zlom (Rothkamm et al., 2003). Na  $\gamma$ -H2AX se váže protein MDC1 interagující s MRN komplexem. Tím dochází k další aktivaci ATM, což vede k amplifikaci signálu o poškození DNA. MDC1 vytváří pozitivní zpětnou vazbu tak, že se nakonec  $\gamma$ -H2AX kompletně rozšíří okolo zlomu (Hartlerode & Scully, 2009). Buňka ovšem k regulaci organizace histonů nevyužívá jen fosforylaci. Dále se uplatňuje např. acetylace histonů, která vede k rozvolnění chromatinu tak, aby reparační proteiny měly přístup k poškozenému místu na DNA (Gong & Miller, 2013).

MRN komplex dále podněcuje buňku, aby zahájila opravu DSB jedním ze dvou způsobů oprav, které má k dispozici (Mahaney et al., 2009). Buňky mohou DSBs opravovat buď nehomologním spojováním konců (*non-homologous end joining*, NHEJ) nebo homologní rekombinací (*homologous recombination*, HR)(Ménézo et al., 2010).

### 3.1.1 Nehomologní spojování konců

NHEJ je proces opravy DSBs (obr. 4), který je dominantní u většiny savčích somatických buněk (Pannunzio et al., 2018), a to zejména proto, že nevyžaduje masivní přestavby chromatinu v okolí zlomu na rozdíl od HR (Kakarougkas & Jeggo, 2014).

Oprava pomocí NHEJ je iniciována vazbou heterodimeru proteinů KU70 a KU80 na zlomené konce vlákna DNA. Díky struktuře KU70/80 do tvaru prstence je umožněna specifická vazba s vysokou afinitou. Protein se může klouzat po molekule DNA bez spotřeby energie, např. ATP (Z. Zhang et al., 2001; Van Gent & Van Der Burg, 2007). Heterodimer KU70/80 navázaný na DNA se podílí na ochraně konců před atakem nukleáz (Kakarougkas & Jeggo, 2014).

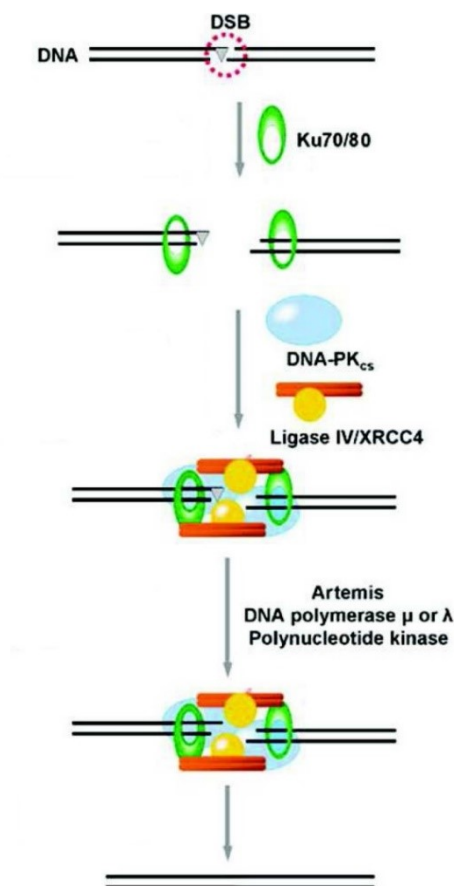
Po navázání se KU70/80 přesouvá po vlákně směrem pryč od zlomu tak, aby uvolnil místo pro vazbu dalších proteinů. Tím je např. katalytická podjednotka DNA-dependentní protein kinázy (DNA-PKcs), kterou KU právě svým přesunem rekrutuje k vazbě. Tyto dva proteiny se spolu sestavují do komplexu DNA-dependentní protein kinázy (DNA-PK), díky čemuž kináza nabyde schopnost fosforylovat cílové proteiny – má serin/threoninovou aktivitu. Nejprve však dochází k její autofosforylaci. Bylo prokázáno, že na fosforylaci komplexu se může podílet také ATM a ATR kináza. Zároveň komplex DNA-PK funguje tak, aby spojil a držel u sebe zlomené konce DNA. Následujícím krokem je spojení konců DNA. Na to je vyžadován komplex ligázy IV a proteinu XRCC4. Ligáza IV potřebuje XRCC4 ke svému fungování, zejména kvůli stabilitě a správnému a specifickému zacílení přímo do místa zlomu. Zároveň obě složky komplexu ligázy interagují s heterodimerem KU70/80 a všechny tyto komponenty a jejich vzájemné provázání je nezbytné pro efektivní spojení DNA konců (Bailey et al., 1999; Van Gent & Van Der Burg, 2007; Mahaney et al., 2009; Kakarougkas & Jeggo, 2014).

Proces zmíněný výše může fungovat za předpokladu, že se zlomené konce DNA mohou rovnou ligovat k sobě, nemají žádný přesah. Často ale může nastat situace, kdy je přímé spojení narušeno kvůli nekompatibilitě konců. Ta může být způsobena chemickými modifikacemi konců, poškozením bází nebo cukrfosfátové kostry působením ionizačního záření nebo vznikem nepárujících DNA přesahů. Aby mohla oprava DNA pokračovat, je nutná vazba nukleázy, která konce upraví, aby bylo možné je spojit. Savci mají pro tento účel mnoho enzymů, které slouží na odstranění poškozených částí DNA. Jednou z nich je nukleáza Artemis. Potřebuje být, ke spuštění své aktivity, fosforylována, o což se v tomto případě stará komplex DNA-PK (Van Gent & Van Der Burg, 2007; Pannunzio et al., 2018).

Zároveň v buňce existuje alternativní systém spojování konců (*alternative non-homologous end joining*, alt-NHEJ), který při úpravě konců spoléhá na vytvoření mikrohologie mezi vlákny. Jedná se o homologii méně než 4 nukleotidy, díky níž může následovat dokončení opravy. Právě úseky mikrohologie byly nalezeny např. na koncích translokovaných úseků chromosomů (Van Gent & Van Der Burg, 2007).



V případě, že se na koncích DNA objeví poškozené nebo chybějící báze, a tím je znemožněna komplementarita vláken, jsou k jejich zpracování a úpravě vyžadovány polymerázy. Konkrétně se jedná o polymerázy Pol  $\mu$  a Pol  $\lambda$ . To, jaká polymeráza se na DNA váže, závisí na typu poškození řetězce (Van Gent & Van Der Burg, 2007; Mahaney et al., 2009).



Obr. 4: Nehomologní spojování konců. Šedý trojúhelníček představuje konec DNA, který vyžaduje určitou úpravu před spojením konců. Převzato z (Van Gent & Van Der Burg, 2007), dále upraveno.

Další molekulou, která se může do místa zlomu vázat a účastnit se oprav, je např. MRN komplex. Protein RAD50, který je součástí komplexu, má dvě dlouhá raménka s koncem do tvaru háčku. Tam je umístěn zinkový kation  $Zn^{2+}$ . Díky této struktuře může být MRN komplex zapojen do přidržování konců v těsné blízkosti. Heterodimer KU70/80 je v dynamické rovnováze mezi stavy, kdy je navázán a kdy je volný. Aby se ale předešlo momentu, kdy je KU heterodimer ve volném stavu a konce tak nejsou drženy v blízkosti, v pozici vedle sebe, může být MRN komplexem nahrazen a ten za něj plní tuto funkci (Van Gent & Van Der Burg, 2007). MRE11 nukleáza může také, stejně jako nukleáza Artemis, upravovat konce DNA, např. odstraňování vlásenkových struktur nebo nepárujících přesahů (Hartlerode & Scully, 2009).

Je důležité zmínit, že pokud dojde při opravování DSBs k nějaké výše zmíněné opravě, ať už pomocí některé z nukleáz nebo polymeráz, objeví se na tomto místě krátké úseky inzercí nebo delecí. Proto právě alt-NHEJ je procesem náchylným k chybám (Chapman et al., 2012). Problémem je možný vznik „in-del“ mutací, které jsou spojené s možným posunem čtecího rámce.

Zároveň, při tomto procesu opravy není nijak možné vrátit sekvenci, která byla ztracena, na rozdíl od HR, která obnovuje genetickou informaci ze ztraceného úseku použitím sesterské chromatidy jako templátu (Kakaroukaskas & Jeggo, 2014).

### 3.1.2 Homologní rekombinace

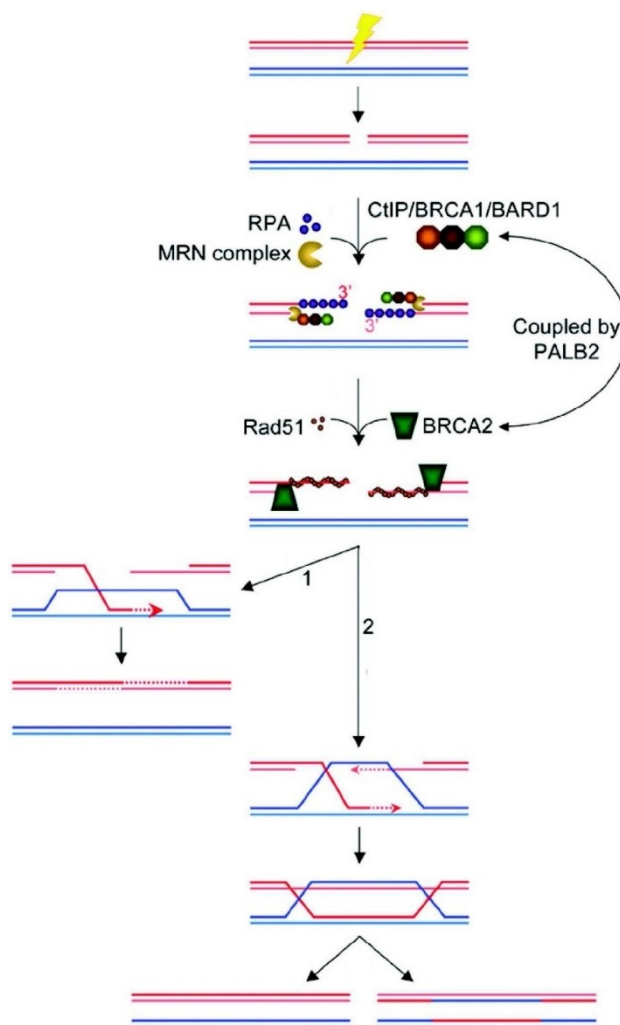
HR je proces, který dominuje nad NHEJ zejména při opravách zlomů vyskytujících se v replikačních vidličkách, vznikajících neopravenými SSBs (Shibata, 2017). Zároveň se ukazuje, že DSBs vzniklé v oblastech heterochromatinu preferenčně opravuje HR spíše než NHEJ (Kakaroukaskas & Jeggo, 2014).

Prvním krokem HR je resekce jednoho vlákna DNA v místě zlomu od 5' ke 3' tak, aby se na druhém, komplementárním vlákně vytvořil 3' jednořetězcový přesah (obr. 5). Do místa zlomu se váže MRN komplex a na vytvoření přesahujícího ramene se podílí MRE11 endonukleáza (Winship et al., 2018). Společně s MRN komplexem se váže také protein CtIP (Delabaere et al., 2017), který stimuluje aktivitu MRE11 a je esenciální při této iniciační fázi (Shibata, 2017). Na vzniklé přesahující rameno se okamžitě váže RPA protein, který má za úkol rozplést sekundární strukturu DNA a chránit vlákno před opětovným vytvořením. Následně je protein RPA nahrazen RAD51 rekombinázou. Jelikož se protein RPA váže k ssDNA pevněji než RAD51, jsou vyžadovány další, přídavné proteiny, které napomáhají k odstranění proteinu RPA a navázání RAD51. V savcích buňkách se jedná konkrétně o komplex proteinů BRCA1, BARD1 a BRCA2 (Hartlerode & Scully, 2009; Kakaroukaskas & Jeggo, 2014). Všechny tyto proteiny jsou navzájem drženy scaffold proteinem PALB2. Ztráta jakéhokoli z těchto proteinů narušuje průběh HR (Chapman et al., 2012). Vlákno s navázanou RAD51 je připravené k invazi do nepoškozené dvouvláknové DNA, která slouží jako templát, a ze které bude moct dojít k obnově poškozené genetické informace. K tomu je většinou využívána sesterská chromatida, výjimečně i homologní chromosom (Tauchi et al., 2002; Delabaere et al., 2017). Invaze ramene vytvoří D-smyčku a konec invadujícího vlákna je prodlužován polymerázou, která syntetizuje podle homologní sekvence nepoškozeného chromosomu (Delabaere et al., 2017).

Následují dvě možnosti, jak oprava pokračuje dál. Tento nově nasyntetizovaný řetězec poté disociuje od templátu a spojuje se opět s druhým koncem původního DSB (obr. 5, šipka 1). Tím nedochází ke crossing-overu a jsou tak opravovány zejména mitoticky se dělící buňky. Druhou možností je vytvoření dvojité Hollidayovy struktury (obr. 5, šipka 2). V tomto případě je D-smyčka rozšířena tak,

že vzniknou dvě Hollidayovy spojení, takže u druhého vlákna, které má vytvořené 3' přesah, ale neinvazivní, probíhá rovněž syntéza nukleotidů podle templátu. Rozhodujícím faktorem, zda dojde nebo nedojde ke crossing-overu, jsou místa, na kterých je dvojité Hollidayova struktura rozštěpena. Na tuto možnost se spoléhají zejména buňky podstupující meiotické dělení (Delabaere et al., 2017).

Díky použití sesterské chromatidy nebo homologního chromosomu je proces HR převážně bezchybný na rozdíl od NHEJ (Horta et al., 2020).



Obr. 5: Homologní rekombinace. Převzato z (Hartlerode & Scully, 2009), dále upraveno.

To, jaký proces opravy DSBs bude v buňce probíhat, závisí zejména na fázi buněčného cyklu. NHEJ může operovat během všech fází buněčného cyklu, zejména je však aktivní v průběhu G1 fáze (Vilenchik & Knudson, 2003). Oproti tomu HR pracuje až po DNA replikaci, ve chvíli, kdy je přítomná sesterská chromatida, tedy v pozdní S a G2 fázi (J. Y. Ma et al., 2019). Při experimentu ověřujícím platnost tohoto tvrzení se prokázalo, že buňky defektní v HR jsou nejvíce citlivé na poškození v S a G2 fázi a nejméně citlivé v G1 fázi (Rothkamm et al., 2003). Toto tvrzení potvrzuje také to, že hladina CtIP proteinu, hrajícího roli v průběhu HR, je nízká v G1 fázi, ale exprese narůstá, jak buňka postupuje ke G2 fázi (Chapman et al., 2012).

Neméně důležitá je při výběru opravy DSBs také balance v regulaci úpravy konců. 53BP1 hraje zásadní roli při NHEJ tím, že svou vazbou na DNA způsobuje kompaktaci chromatinu a tím zabraňuje nukleázám v resekci konců. Zejména ale během S/G2 fáze probíhá oprava pomocí HR, kdy dochází k vytvoření naprosto klíčového 3' přesahu, a musí tedy k určité resekci konců dojít. I v tomto případě zde hraje důležitou roli 53BP1, kdy reguluje rozsah resekce. Pokud je totiž 53BP1 navázaný na chromatinu, zabraňuje masivnímu sestřihnutí konců, tzv. hyper-resekci (Chapman et al., 2012; Ochs et al., 2016).

## 3.2 Oprava dalších poškození

Všechny organismy včetně člověka si vyvinuli několik DNA reparačních systémů, které jim umožňují vypořádat se s rozličnými druhy poškození. Poškození, vyskytující se pouze na jednom řetězci je opravováno hlavními třemi mechanismy: bázeová excisní oprava (*base excision repair*, BER), nukleotidová excisní oprava (*nucleotide excision repair*, NER) a oprava chybného párování bází (*mismatch repair*, MMR) (Carroll & Marangos, 2013; Nospikel, 2007). Všechny tyto mechanismy byly rovněž nalezeny v oocytech (Horta et al., 2020).

### 3.2.1 Nukleotidová excisní oprava

NER je reparační systém, který opravuje široké spektrum DNA poškození způsobující destabilizaci a deformaci tvaru dvoušroubovice. Jedná se např. o mezivláknové cross-linky, cyklobutan pyrimidinové dimery a pyrimidin-pyrimidon (6-4) fotoprodukty, jejichž vznik je způsoben účinkem UV záření (Wood, 1999; Nospikel, 2007).

Průběh opravy lze shrnout do několika kroků zahrnující: 1) na základě helikálního pnutí rozpoznání místa poškození, 2) vystřížení úseku poškozené DNA, 3) syntéza nukleotidů na chybějících místech a 4) spojení vlákna ligázou (obr. 6)(Ozturk & Demir, 2011).

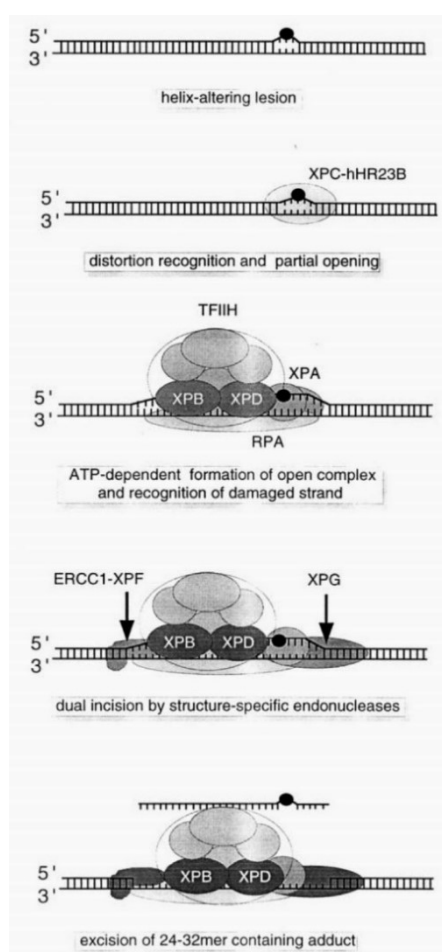
Celý proces iniciuje protein XPC, který nasedá do místa poškození a tím umožňuje vazbu dalších proteinů. Přisedá k němu transkripční faktor TFIIH mající dvě podjednotky s helikázovou aktivitou, díky které mohou vytvořit tzv. „otevřený komplex“. Jde o přechodnou ssDNA strukturu okolo léze mající přibližně 25-30 nukleotidů. Na oba úseky ssDNA nasedá protein RPA (fungující také v procesu HR), který pomáhá nasednutí dvou endonukleáz do otevřeného komplexu. Ty začínají štěpit vlákno na jeho okraji, tedy na přechodu mezi ssDNA a dsDNA. Po odstranění oligonukleotidu obsahujícího poškození je mezera na DNA dosyntetizována polymerázou a zacelena ligázou (Wood, 1999; Nospikel, 2007; Araújo & Kuraoka, 2019).

### 3.2.2 Bázová excisní oprava

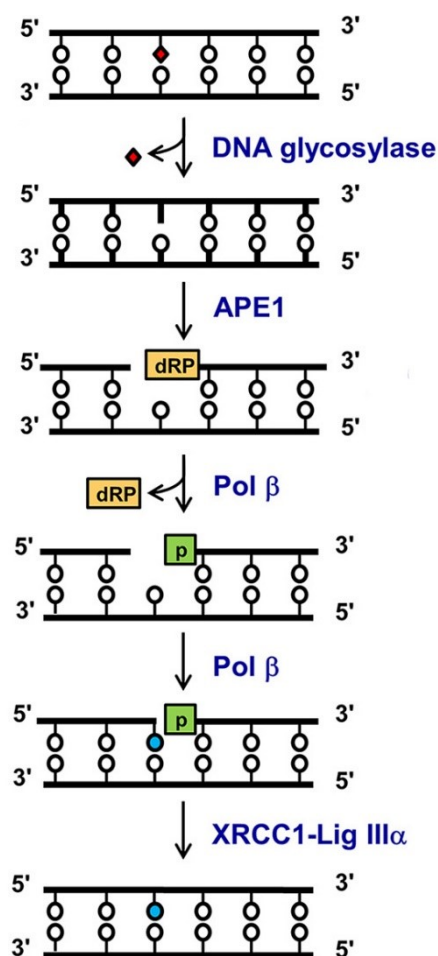
BER se podílí na odstranění malých DNA modifikací vznikajících deaminací, methylací a oxidací, postihující pouze jedno vlákno DNA, např. přítomnost uracilu nebo oxidované báze vzniklé účinkem ROS. Na rozdíl od NER tato poškození nezkrslují strukturu DNA, proto rozpoznání poškození funguje na úrovni kontroly jednotlivých bází (Ozturk & Demir, 2011; García-Rodríguez et al., 2018).

Modifikované báze jsou rozeznány DNA glykosylázou (obr. 7), která specificky odstraní jen poškozenou bázi z genomu štěpením N-glykosidické vazby za vzniku AP místa. Toto místo je rozpoznáno endonukleázou AP1, která vyštěpí cukrfosfátovou kostru za vzniku jednonukleotidové mezery. Tu následně může polymeráza díky 3' OH konci dosyntetizovat a ligáza společně v komplexu se stabilizačním proteinem XRCC1 spojit do souvislého vlákna. V buňce rovněž fungují DNA glykosylázy, které nejen, že odstraňují bázi, ale také mají funkci endonukleázy, takže rovnou vyštěpí i kostru DNA (Carter & Parsons, 2016).

Již zmíněná nejčastěji modifikovaná báze guanin je oxidována na 8-oxoG, který je z genomu odstraňován právě pomocí BER, za účasti specifické DNA glykosylázy OGG1 (Ménézo et al., 2010).



Obr. 6: Nukleotidová excisní oprava.  
Převzato z (Wood, 1999)

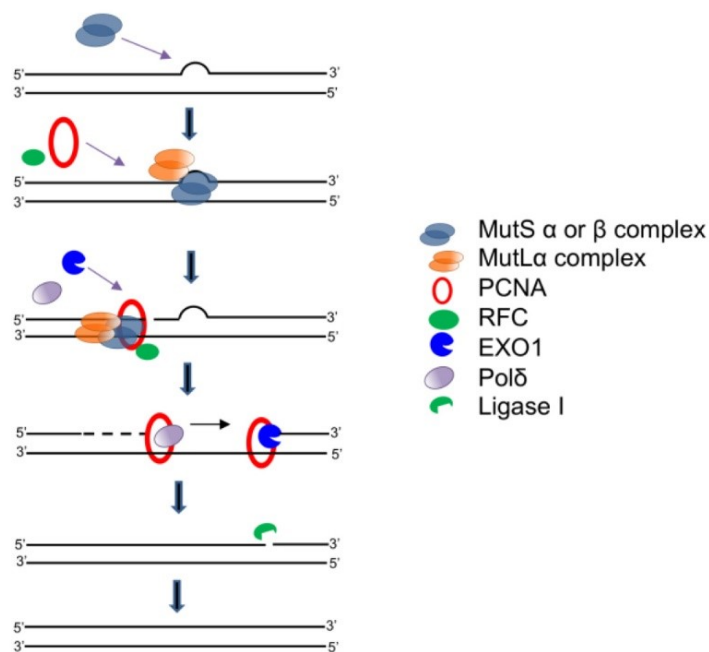


Obr. 7: Bázová excisní oprava. Převzato z (Carter & Parsons, 2016), dále upraveno

### 3.2.3 Oprava chybného párování bází

MMR je určena na odstraňování nesprávně párujících sekvencí. Podílí se také na eliminaci chyb vzniklých při inzerci/deleci úseku DNA nebo DNA replikaci. Replikační chyby vznikají inkorporací špatného nukleotidu. To se stane přibližně jedenkrát na  $10^7$  nukleotidů (Ozturk & Demir, 2011).

Oprava začíná vazbou proteinu MutS $\alpha$  nebo MutS $\beta$  do nepárujícího místa, k němuž se poté váže protein MutL $\alpha$  (obr. 8). Oba proteiny jsou heterodimery, proto po sestavení tvoří tetramerický komplex. Ke komplexu se připojuje protein PCNA sloužící jako svorka, jehož funkcí je také zvýšení účinnosti polymerázy později fungující v tomto procesu. Tetramer proteinů se spolu PCNA posouvá po vláknech směrem od nepárujícího místa tak, aby vytvořily místo zlomu na dceřiném vlákně. Do tohoto místa se váže exonukleáza EXO1, která postupně odstraňuje úsek nukleotidů včetně nepárujícího místa. Ke svorkovému proteinu se naváže polymeráza, která syntetizuje chybějící nukleotidy a nakonec opět ligáza vlákno zacelí (Liu et al., 2017).



Obr. 8: Oprava chybného párování bází.

Převzato z (Liu et al., 2017)

### 3.3 Kontrolní body DNA poškození

Jedna z odpovědí buněk na poškození DNA, obzvláště na DSBs, je aktivace kontrolních bodů tak, aby buňka měla čas vzniklá poškození opravit, a tím zachovat genomovou integritu, než dojde v důsledku jejich vzniku k nevratným změnám genomu nebo aktivaci apoptotické dráhy (Vilenchik & Knudson, 2003; Bartek & Lukas, 2007).

Hlavními komponenty těchto kontrolních bodů jsou kinázy z rodiny PIKK, jejichž hlavními funkcemi je udržování genomové stability, kontrola buněčného cyklu nebo odpověď na DNA poškození

(Banin et al., 1998). Konkrétně se zde jedná o ATM, ATR a DNA-PKcs. Ačkoli všechny kinázy mají afinitu k DNA, jejich vazba do místa poškození je umožněna specifickými proteiny – např. pokud se ATR váže na ssDNA, je třeba ATR interagující protein (ATRIP). Vazba DNA-PKcs do místa poškození zase vyžaduje heterodimer KU70/80 (viz. kapitola 3.1.1). V případě ATM je do vazby do místa DSB zapojený MRN komplex (Falck et al., 2005; Bolcun-Filas et al., 2014). Tyto kinázy fosforylují řadu svých substrátů, mezi nimi např. i kinázy CHK1 a CHK2 (Solc et al., 2010).

### 3.3.1 G1/S kontrolní bod

Tento kontrolní bod je zodpovědný za kontrolu vstupu do S fáze, aby se předešlo kolapsu replikace v důsledku přítomnosti DNA poškození (Benedict et al., 2018).

Hlavním efektozem této dráhy je transkripční faktor P53. Po vzniku DNA poškození dojde k aktivaci ATM/ATR kinázy, která ho fosforyluje na pozici Ser15. Takto fosforylovaný P53 reguluje expresi dalších molekul, např. stimuluje transkripci inhibitoru buněčného cyklu P21. P21 svou vazbou na CDK2 inhibuje přechod do S fáze (Mirzayans et al., 2012). Zároveň v případě rozsáhlého DNA poškození může aktivita P53 spouštět apoptotickou dráhu. V tom případě ovlivňuje transkripci proapoptických faktorů jako je BAX, PUMA nebo NOXA (Rocha et al., 2003; Mirzayans et al., 2012).

Po vzniku DNA poškození může být přechod z G1 do S fáze rovněž zastaven degradací CDC25A. Tato fosfatáza je klíčová pro přechod do S fáze a v případě, že se v buňce objeví DNA poškození, se stává součástí ubiquitinační dráhy a je směřována do proteasomu. Po detekci poškození dochází k aktivaci ATM/ATR kináz, které aktivují CHK1/CHK2 kinázu. Ta fosforyluje CDC25A na pozici Ser123, vedoucí k uspořádání její degradace. Protože není fosfatáza přítomná, přetrvává inhibiční fosforylace na CDK2, takže je zablokován postup do S fáze (Mailand et al., 2000; Donzelli & Draetta, 2003).

### 3.3.2 G2/M kontrolní bod

V případě, že je v buňce přítomné DNA poškození, je nutné zamezit vstupu do M fáze. Toho buňka dosáhne zastavením buněčného cyklu. Má tak dostatek času na opravení, což je důležité zejména proto, aby se poškozená DNA nedostala do dceřiných buněk (Bassermann et al., 2008).

Hlavní molekulou tohoto kontrolního bodu je CDK1 a regulace její aktivity. Pro svou aktivaci vyžaduje vazbu cyklinu B, zatímco negativní regulace CDK1 je spojena s kinázami WEE1B a MYT1. Ty ji fosforylují na pozicích Thr14 a Tyr15. WEE1B je tyrosin kináza, zatímco MYT1 má duální specifitu a může fosforylovat na obou pozicích, preferenčně však na pozici Thr14. Tato inhibiční fosforylace je odstraněna CDC25 fosfatázami. Ty ovšem mohou plnit svou funkci jen v případě, že ony samy nejsou inhibičně fosforylovány. O inhibiční fosforylaci CDC25 se starají CHK1 a CHK2 kinázy. Konkrétně fosforylace CDC25A vede k její degradaci, zatímco fosforylace CDC25B a C vede k jejich inhibici.



V momentu, kdy jsou DNA poškození opravena a nic buňce vstupu do M fáze nebrání, dochází k defosforylaci CDC25B a C fosfatáz. Tím se aktivují a mohou dále defosforylovat CDK1. Defosforylovaná CDK1 dále váže cyklin B (Potapova et al., 2009; Solc et al., 2010).

Je pozoruhodné, že je tento kontrolní bod svým průběhem i účastí jednotlivých molekul velmi podobný obnovení meiózy u oocytů (viz kapitola 1.5). Důvodem proto zřejmě je, že stejně jako somatické buňky čekají na vstup do M fáze, oocyty čekají na znovuzahájení meiózy (Solc et al., 2010).

## 4. Reakce oocytů na DNA poškození

### 4.1 Eliminace oocytů v primordiálních folikulech

Oocyty v primordiálních folikulech v diktyotenním stádiu jsou v průběhu reprodukčního období poměrně citlivé na DNA poškození. To je umocněno dlouhověkostí člověka, a tím pádem i dlouhou dobou, po kterou jsou oocyty ve vaječnících uloženy. Aby se předešlo mutacím v zárodečné linii, je velice důležitá přítomnost systému na detekci a reparaci DNA poškození, a zároveň také možnost odstranění oocytů, u nichž je ohrožena genomová integrita, skrze apoptózu (Kerr et al., 2012). DNA poškození, obzvláště pak DSBs, mohou vznikat jednak exogenním působením, ale jsou také buňkou vědomě vytvářeny při meiotické rekombinaci v profázi I (Winship et al., 2018). U savců dochází ke kontrole, zda v buňce došlo ke správnému dokončení rekombinace. V opačném případě buňka podstupuje apoptózu (Carroll & Marangos, 2013).

#### 4.1.1 Meiotická rekombinace

Meiotická rekombinace je proces, který se odehrává během prvního meiotického dělení v profázi, konkrétně v leptotene (Carroll & Marangos, 2013). Dochází při ní k výměně genetického materiálu mezi dvěma nesesterskými chromatidami homologních chromosomů. Účelem je jednak vytvoření nových alelických kombinací a zvýšení genetické diverzity v populaci a jednak spárování homologních chromosomů pro jejich korektní segregaci v anafázi I (Winship et al., 2018). Aby mohlo dojít k samotné výměně částí chromosomů, musí rekombinace přirozeně zahrnovat vznik DSBs (Carroll & Marangos, 2013).

Na začátku profáze se homologní chromosomy přibližují a spojují se tak, že utvoří tzv. bivalenty. Aby v tomto útvaru chromosomy vydržely, jsou drženy můstky zvanými chiasmata. Ty jsou stabilní až do doby metafáze-anafáze, kdy se chromosomy připojují na dělicí vřeténko a každý z nich míří na opačný pól buňky (Carroll & Marangos, 2013). Tvorba DSBs je iniciována aktivitou proteinu SPO11 (Chapman et al., 2012). Oocyty myší, kterým chybí Spo11, mohou být schopné nějakou dobu přežít, ale pokud chtějí dokončit první meiotické dělení, jejich homologní chromosomy nedokážou správně



segregovat, právě z důvodu absence chiasmat, díky čemuž zůstávají blokováni v meióze I (Carroll & Marangos, 2013). Velmi důležitá je v průběhu rekombinace také ATM kináza – zvláště pak pro opravu vzniklých DSBs. Její důležitost prokazuje úplná infertilita myší, kterých ATM chybí. Jejich oocyty mají v průběhu profáze problémy s neopravenými DSBs vedoucí k aktivaci apoptotické dráhy (Solc et al., 2010).

#### 4.1.2 TAp63 proapoptotická dráha

Klíčovým tumor supresorovým proteinem savců je P53. Ten je však přítomen pouze u somatických buněk. V oocytech se vyskytuje homolog P63, převážně je zastoupena transaktivací (TA) isoforma TAp63. Exprese TAp63 je nejvyšší v primordiálních a primárních folikulech, zatímco v průběhu vývoje směrem k ovulaci dochází k jejímu snížení. Právě tato isoforma je zásadní v odpovědi na DNA poškození a následné indukci apoptózy oocytů (Suh et al., 2006).

Po vzniku DSBs dochází k aktivaci kinázy CHK2, která fosforyluje TAp63, který díky tomu aktivuje transkripci proapoptotických faktorů, např. PUMA, NOXA, BAX (Livera et al., 2008). Tato dráha je svým mechanismem velmi podobná kontrolnímu bodu mezi G1/S fázemi u somatických buněk (viz kapitola 3.3.1).

PUMA a NOXA patří do skupiny BH3-only proteinů a společně s BAX, BAK a dalšími spadají do Bcl-2 rodiny (Myers et al., 2014). Experimenty prokazující, jak jsou PUMA a NOXA klíčové pro poškozením indukovanou apoptózu, spočívají ve vytvoření myší, *Puma*<sup>-/-</sup> a *Puma*<sup>-/-</sup> *Noxa*<sup>-/-</sup>. Oocyty v primordiálních folikulech těchto myší byly po ozáření  $\gamma$ -zářením zachráněny před apoptózou. Byly aplikovány dvě dávky záření – menší (0,45 Gy) a větší (4,5 Gy). U *Puma*<sup>-/-</sup> myší došlo po 0,45 Gy ozáření k záchraně před apoptózou průměrně u 16 % oocytů, u *Puma*<sup>-/-</sup> *Noxa*<sup>-/-</sup> to bylo dokonce 52 % oocytů. Po ozáření 4,5 Gy nepodstoupilo apoptózu u *Puma*<sup>-/-</sup> myší v průměru 12 % oocytů, u *Puma*<sup>-/-</sup> *Noxa*<sup>-/-</sup> 94 % oocytů. U *wt* myší došlo po obou dávkách ozáření ke zničení všech primordiálních folikulů. K tomu samému došlo také u oocytů myší *Noxa*<sup>-/-</sup>. Z toho tedy lze vyvodit, že PUMA, v menším rozsahu NOXA, zprostředkovávají apoptózu oocytů v primordiálních folikulech (Kerr et al., 2012).

Otázkou zůstává, zda *Puma*<sup>-/-</sup> a *Puma*<sup>-/-</sup> *Noxa*<sup>-/-</sup> myši, jejichž oocyty byly ozářeny ať už menší či větší dávkou, mají šanci zplodit potomky, tedy jakou kvalitu oocytů budou mít, jestli došlo k efektivní opravě poškození vzniklých následkem ozáření, a jsou-li tedy oocyty reprodukce schopné. V experimentu proto následovalo pozorování ozářených myší, nakolik mají schopnost produkce životaschopných potomků. K tomu došlo u 13 z 16 *Puma*<sup>-/-</sup> myší a 9 z 12 *Puma*<sup>-/-</sup> *Noxa*<sup>-/-</sup> myší. Naopak všechny ozářené *wt* myši byly sterilní (Kerr et al., 2012).

Můžeme si ale dále položit otázku, zda potomci těchto myší, ač oni sami životaschopní, budou mít schopnost se rozmnožovat? Zda se následek ozáření jejich rodičů nepromítne až v jejich generaci? 14 samic, které byly generací F1 (potomci ozářených rodičů), bylo připraveno k chovu a 13 z nich se podařilo úspěšně se rozmnožit a porodit své vlastní potomky. V tomto experimentu žádné ze zvířat nemělo žádné zjevné anomálie nebo choroby (Kerr et al., 2012).

I přesto bychom měli zůstat v tomto ohledu obezřetní, protože tento experiment je jen jedna ukázka z mnoha, zároveň pokud se například různé vývojové vady či nemoci neobjevily v generaci F1 nebo F2, není jisté, že nedojde k jejich projevu později. Samotní autoři experimentu potvrzují, že je nezbytné dlouhodobé pozorování zdravotního stavu myší i v dalších generacích.

Jiný experiment věnující se porovnávání mezi *Puma*  $-/-$  a *wt* myšmi spočíval ve spočítání zárodečných buněk ve vaječnících v průběhu embryonálního vývoje (a to v době, kdy se buňky formují do klastrů). Počet zárodečných buněk ve vaječníku byl u *Puma*  $-/-$  embryí cca 6400 vs. 2850 u *wt* embryí. To samé bylo zopakováno i desátý den po narození, kdy byl určen počet primordiálních folikulů ve vaječníku – *Puma*  $-/-$  8500 folikulů vs. *wt* 4500 folikulů. Finální, téměř dvojnásobný počet folikulů u *Puma*  $-/-$  myší oproti *wt* je dán přítomností takových oocytů, u kterých v průběhu vývoje nedošlo k apoptóze (Myers et al., 2014).

Toto téma je velmi aktuální ve spojení s ženami, které podstupují léčbu rakoviny, kdy vedlejšími účinky chemoterapie je právě vznik DNA poškození v oocytech, jejich následná apoptóza vedoucí k vyčerpání zásob oocytů ve vaječníku a neplodnost (Livera et al., 2008; Kerr et al., 2012).

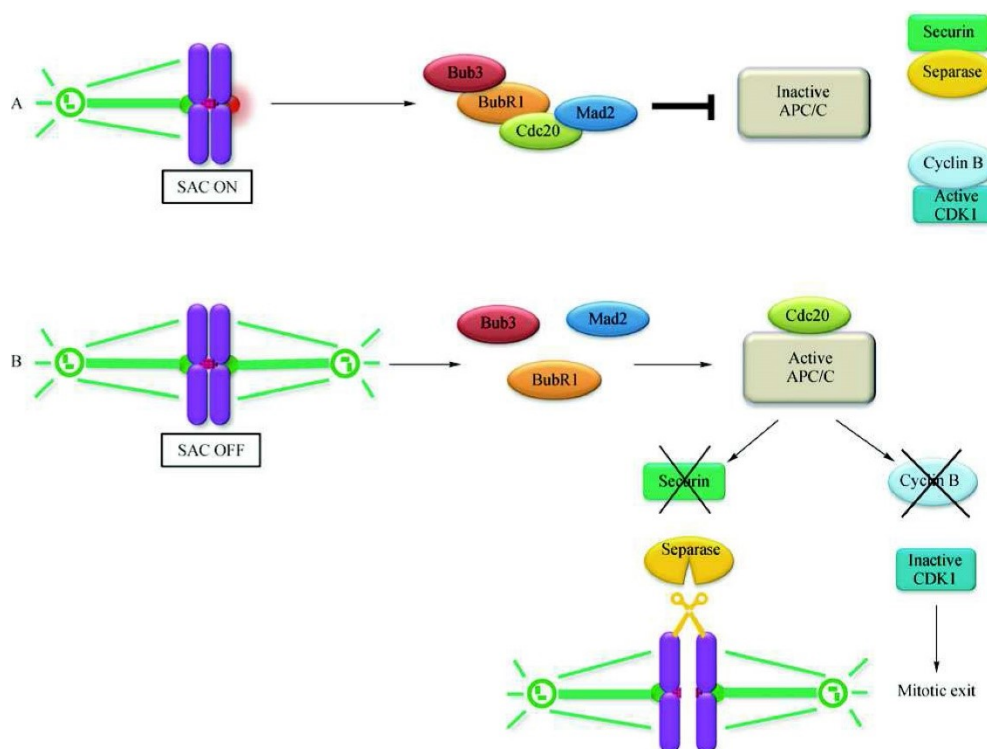
## 4.2 Metafáze/anafáze kontrolní bod (*spindle assembly checkpoint, SAC*)

Aby se při mitotickém dělení somatických buněk předešlo poruchám v segregaci chromosomů, funguje v buňce metafáze/anafáze kontrolní bod (SAC). Kinetochory jsou struktury, které asociují s centromerami chromosomů. Během dělení buněk se připojují na dělicí vřeténko, čímž mikrotubuly stabilizují. SAC může inhibovat přechod z metafáze do anafáze a následné ukončení M fáze buněčného cyklu. Dochází k tomu např. kvůli nepřipojeným nebo špatně připojeným kinetochorům nebo pokud nejsou všechny chromosomy seřazeny v metafázní rovině (Brunet & Maro, 2005; Barbosa et al., 2011).

Sesterské chromatidy jsou drženy v oblasti centromery kohezinem. Ten, aby se mohly chromatidy rozejít v anafázi každá k jednomu z pólů buňky, musí být degradován enzymem separázou. Aktivita separázy je pod kontrolou sekurinu. Když je totiž v metafázi separáza vázaná k sekurinu, není aktivní, a tím je oddálen počátek anafáze. Proto, když má dojít v anafázi k rozštěpení kohezinu mezi chromatidami separázou, musí být sekurin degradován. Jeho množství v buňce je regulováno APC/C komplexem (*anaphase-promoting complex/cyclosome*). Jedná se o E3 ubiquitin ligázu, která při nástupu anafáze směřuje sekurin a cyklin B do proteasomu k degradaci. Degradace cyklinu B je důležitá

z důvodu, že se CDK1 také podílí na inhibici separázy a ukončení mitózy (Niault et al., 2007; Barbosa et al., 2011).

V případě, že kinetochory nejsou připojeny k mikrotubulům (obr. 9A) a nemělo by tedy dojít k nástupu anafáze, podněcuje SAC sestavení komplexu proteinů, které inhibují APC/C v jeho aktivitě. Konkrétně se jedná o proteiny z rodiny MAD a BUB (MAD2, BUB3, BUBR1), které společně inhibičně interagují s proteinem CDC20, který působí jako aktivátor APC/C. Ten je klíčový pro fungování APC/C, který ke správné aktivitě vyžaduje jeho vazbu (Alfieri et al., 2016). Pokud dojde v buňce k defektu v aktivitě SAC, má tato buňka vyšší karcinogenní potenciál než buňka s plně funkčním SAC (Barbosa et al., 2011).



Obr. 9: Průběh metafáze/anafáze kontrolního bodu. A) SAC aktivní z důvodu nepřipojeného kinetochoru (červený kroužek). B) SAC neaktivní, všechny kinetochory připojeny. Převzato z (Barbosa et al., 2011)

Během maturace oocytů dochází ke dvěma meiotickým dělením, přičemž obě dělení jsou asymetrická. Díky tomu zůstane ve větší části, v oocytu, většina naakumulovaných maternálních zásob a z menší části dojde k vydělení 1. a 2. pólového tělíska (Brunet & Maro, 2005). První meiotické dělení je ale jiné na rozdíl od mitotického dělení. Na opačné póly buňky totiž nesměřují jen chromatidy, ale celé dvouchromatidové homologní chromosomy (Wassmann et al., 2003).

Chyby při segregaci chromosomů vznikající při nesprávně proběhnutém dělení, mohou – obzvláště pak tedy během dělení buněk zárodečné linie – mít vážné následky. Chyby při prvním

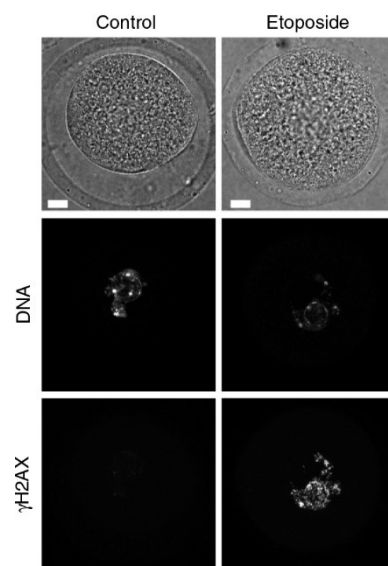
meiotickém dělení oocytů tak mohou vést ke vzniku trisomií – např. trisomie 21 (Downův syndrom) (Niault et al., 2007).

Účast SAC v odpovědi na DNA poškození v savčích oocytech je poměrně kontroverzní. Na jedné straně panuje názor, že tento kontrolní bod v oocytech může mít za následek posunutý počátek anafáze. Následuje popis několika experimentů snažících se to prokázat.

Cílem experimentu bylo zjistit, jakou roli hraje SAC v odpovědi na vzniklá DNA poškození a zda je tím ovlivněn počátek nástupu anafáze. Použitím etoposidu, který vazbou s topoizomerázou II vytváří stabilní komplex, dochází ke vzniku DSBs (obr. 10). Ty mohou vést k vytvoření fragmentů chromosomů, které způsobují problémy při dělení buněk. Chybí jim totiž kinetochory, takže nemohou být připojeny na dělicí vřeténko. Vizualizací proteinu MAD2 lze lokalizovat nepřipojené kinetochory. MAD2 byl v kontrolních podmínkách vizualizován asi jen na 3 % kinetochorů. Pokud byl ale přidán etoposid (100  $\mu\text{g/ml}$ ), vznikla DNA poškození, v důsledku čehož bylo přibližně 38 % kinetochorů pozitivních na MAD2. Lze tedy vyvodit, že po vzniku poškození nebyly všechny chromosomy správně srovnané v metafázní rovině a vznikaly fragmenty, které nebyly na vřeténko připojené. Výsledky experimentů tedy naznačují, že oocyty s DNA poškození nejsou schopné aktivovat APC/C. Místo toho se na kinetochorech kumulují proteiny SAC. Autoři tedy experiment uzavírají se slovy, že se SAC účastní zastavení buněčného cyklu v metafázi I jako odpověď na DNA poškození (Marangos et al., 2015).

Důležitost SAC při prvním meiotickém dělení se snažil potvrdit experiment prováděný na myších, kterým chybí jedna alela *mad2* (*mad2* +/-). Snížené množství MAD2 vede k chybným segregacím chromosomů, uspíšení meiózy I a neponechání dostatečného času na správné přichycení kinetochorů k vřeténku. Kvůli těmto missegregacím dospěly do druhého meiotického bloku (tj. metafáze II) oocyty, které byly ve vyšší míře aneuploidní (22,5 %). Spolu s tím koreluje také snížení v plodnosti u samic (21 % *mad2* +/- samic je sterilních, zatímco žádná *mad2* +/+ není sterilní). Myši *mad2* -/- jsou letální již v embryonálním stádiu kvůli vysoké ztrátě chromosomů. Ukázalo se tedy, že ztráta alely genu figurujícím v SAC vede ke zvýšení ztráty chromosomů. Zároveň autoři vyvozují, že SAC je u těchto oocytů inaktivovaný. Díky tomu mohou oocyty předčasně vstoupit do anafáze, i přes poškození, která na chromosomech jsou (Niault et al., 2007).

Objevují se však také experimenty, které posun počátku anafáze z důvodu SAC neprokazují. Neokarzinostatin (NCS) v oocytech indukuje vznik DSBs. Po použití nízkých koncentrací (10 ng/ml) NCS došlo k nárůstu vizualizovaných  $\gamma$ -H2AX foci, ale pouze u čtvrtiny oocytů byl určitý projev problémů při



Obr. 10: Detekce DSBs pomocí  $\gamma$ -H2AX u kontrolního oocyty vs. u oocyty, na který byl aplikován etoposid. Převzato z (Collins et al., 2015)

segregaci chromosomů. Pokud byla aplikována vysoká dávka NCS (100 ng/ml), problémy a vznikající chyby během segregace vykazovalo 90 % oocytů. Počátek anafáze a následná degradace sekurinů nebyla rozdílná mezi kontrolní skupinou a oocyty, na něž byla aplikována koncentrace NCS 10 ng/ml. Naopak, posun nástupu anafáze byl patrný u oocytů s dávkou NCS 100 ng/ml, u kterých byly ve všech případech pozorovány potíže k rozchodem chromosomů. Lze tedy vyvodit, že pokud se aplikuje taková dávka NCS, aby došlo ke vzniku množství DSBs, které je blízké množství zlomů ve fyziologických podmínkách, nedojde k posunu počátku anafáze, i přesto, že je určité množství zlomů přítomno a vznikají již chromosomální fragmenty (Mayer et al., 2016).

#### 4.3 Oprava DNA poškození v zygotě

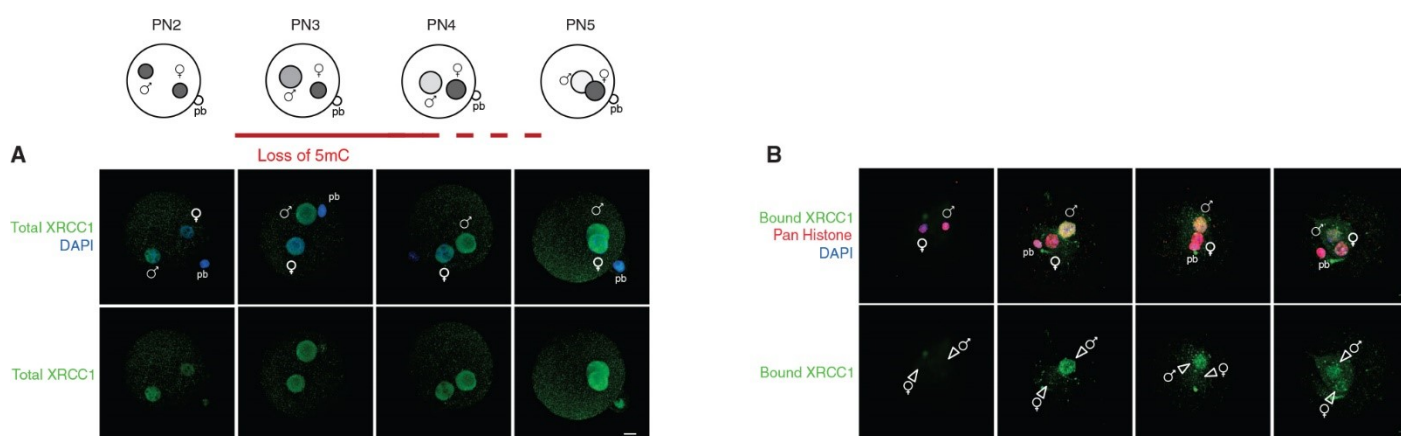
Pro správný vývoj zygoty, respektive embrya, není podstatné jen to, v jakém stavu se vyskytuje oocyt, jaké je kvality, ale záleží zároveň na kvalitě spermie, a zda nenese poškození právě ona. Právě také ve spermii se může, stejně jako v oocyty, naakumulovat DNA poškození a pokud nedojde k opravě, je přeneseno do zygoty (Ahmed et al., 2015). Spermie savců totiž v maturovaném stavu ztrácí schopnost efektivní opravy DNA poškození (Genescà et al., 1992). I přesto, spermie s poškozenou DNA mohou oplodnit oocyt, další vývoj embrya pak však velmi záleží na rozsahu poškození ve spermii. Reparační systém oocyty se může podílet na opravě těchto poškození, vzniklých ještě před oplozením (Ahmadi & Ng, 1999). Spermie jsou např. poměrně citlivé k oxidativnímu poškození, takže oocyt může využít svůj BER reparační systém k jejich opravě (Wyck et al., 2018). K opravě poškození zděděných od jedné z gamet musí dojít ještě před počátkem S fáze před prvním mitotickým dělením, aby se snížila rizika mutagenese a vznik problémů souvisejících s diferenciací buněk a vývoje zygoty (Martin et al., 2019).

Po vytvoření zygoty musí oba, maternální i paternální genom podstoupit epigenetické úpravy, dochází k masivní demethylaci, kdy nastává reset epigenomu gamet tak, aby mohl vzniknout totipotentní stav zygoty. Demethylace genomu spermie je zprostředkována aktivními demethylačními mechanismy, a to ještě před tím, než začne DNA replikace zygoty. Významnou roli při ní hraje opět dráha BER (obr. 11). Proces demethylace je iniciován konverzí 5-methylcytosinu hydroxylázou na 5-hydroxymethylcytosin. Takto modifikovaný cytosin je poté odstraněn pomocí BER (Hajkova et al., 2010; Wyck et al., 2018). Paternální genom nejenže podstupuje demethylaci DNA, ale musí u něj zároveň dojít k reorganizaci chromatinu z protaminů zpět na histony, tak jako je tomu v maternálním genomu (Ladstätter & Tachibana-Konwalski, 2016).

Zaměříme-li se na experimenty prováděné na spermích se vzniklým DNA poškozením a jejich schopnost oplodnit mladé a staré oocyty myši (mladé – 5-8 týdnů, staré – 42-45 týdnů), můžeme vypožorovat jistý trend – konkrétně např. to, že po aplikaci dávky ozáření dochází k výraznému snížení

úspěšnosti vývinu do stádia blastocysty oproti kontrolní skupině, dokonce u skupiny starých oocytů do blastocysty nedospěje žádný, a to již u dávky 1 Gy. Co se týče míry oplození, rozdíl mezi mladými a starými oocyty není nijak výrazný. Zároveň pokud srovnáme míru oplození u oocytů, jež byly oplodněny spermii ozářené dávkou 1 a 30 Gy, dojdeme k závěru, že u obou skupin je míra relativně vysoká a oocyty jsou poměrně oplození schopné (Horta et al., 2020).

Podobných výsledků bylo dosaženo v experimentu s hovězími spermii, na něž byla aplikována dávka  $H_2O_2$ . V kontrolní skupině byla úspěšnost vývoje v blastocystu 40 %. U oocytů, které byly oplozeny  $H_2O_2$  spermii, byl počet výrazně redukován, a to na 9 % (Wyck et al., 2018).



Obr. 11: Vizualizovaný protein XRCC1 v maternálním a paternálním prvojádro zygoty. A) absolutní množství proteinu XRCC1; B) po odmytí solubilních proteinů, jen XRCC1 vázaný na chromatin. Převzato z (Hajkova et al., 2010), dále upraveno

## 5. Reprodukční schopnost v průběhu života

### 5.1 Odkládání mateřství vs. plodnost ženy

Důležitý faktor hrající roli při reprodukci je věk matky. Zvláště v poslední době se u žen objevuje mezinárodní trend odkládání mateřství na třicátá nebo i čtyřicátá léta života. Za důvody tohoto jevu lze dosadit např. kariérní cíle, touha po vyšším vzdělání, náklady spojené s výchovou dítěte a dosažení finanční stability nebo absence partnera, se kterým by si žena přála otěhotnět. Naproti těmto důvodům, proč mateřství posunout, je zde nepopiratelná přítomnost tzv. „biologických hodin“ žen (Leridon, 2004; Koert & Daniluk, 2017). Doba, po kterou totiž bude žena schopna plodit potomky a rozmnožovat se, je ovlivněno množstvím oocytů uložených v oocytech, ve formě primordiálních folikulů (Govindaraj et al., 2015).

Hlavním mechanismem reprodukčního stárnutí je pokles počtu oocytů v těchto klidových folikulech. Ukazuje se také, že pokles není lineární, ale výraznější a prudší s postupujícím věkem ženy.

Období reprodukce směřuje do bodu, kdy je zásoba oocytů vyčerpána a nastává tzv. menopauza. Věk, ve kterém k menopauze dojde, není jasně dán, protože se každá žena narodí s jiným počtem oocytů (500 000 – 1 000 000). Průměrně k tomu však dojde kolem padesátého roku života ( $51 \pm 8$  let). V tu dobu stále ve vaječnících zůstává přibližně 1000 folikulů, které zůstanou nevyužity (Hansen et al., 2008; Myers et al., 2014; D. Zhang et al., 2015). V průběhu života dojde k ovulaci přibližně jen 500 oocytů, zbytek z nich podstupuje apoptózu (Titus et al., 2013).

Zároveň je ovšem důležité podotknout, že plodnost není v průběhu reprodukčního období stále stejná. Maximální plodnost nastává kolem 25. roku života, a poté již po 35. roku, tedy v době, kdy ještě běžně funguje menstruační cyklus, dochází k poklesu (Hansen et al., 2008). S věkem ovšem nedochází jen ke snížení plodnosti nebo úbytku oocytů, dále s těmito jevy souvisí také nárůst případů samovolných potratů (Govindaraj et al., 2015), mimoděložní těhotenství nebo narození mrtvého plodu. Například riziko samovolného potratu prudce vzrůstá po 30. roku života – u žen mezi lety 20-24 bylo v konkrétním pozorování riziko vyčísleno na 8,9 %, zatímco u žen starších 45 let vzrůstá k 74,7 % (Nybo Andersen et al., 2000; Leridon, 2004).

Ve studii, která potvrzuje pokles plodnosti a s tím související nárůst v neúspěšných pokusech otěhotnění, byly u žen zaznamenávány po dobu 4 let případy otěhotnění. Ženy, kterým bylo na počátku studie 30 let, otěhotněly v 94 % případů, zatímco u žen ve věku 40 let to bylo pouze v 65 % (Leridon, 2004).

## 5.2 Ztráta reprodukční schopnosti v průběhu evoluce

Na rozdíl od mužů, kteří mají po celý život reprodukční potenciál zachovaný, mají zárodečné kmenové buňky, u nichž dochází k obnově a produkci dalších zárodečných buněk, tento jev u žen nepozorujeme, mají tedy reprodukční období časově omezené (D. Zhang et al., 2015).

Lze se tedy domnívat, že schopnost se rozmnožovat po celý život byla u žen v evoluci nějakým způsobem nevýhodná, a proto muselo dojít v určitém věku k její ztrátě. U dlouho žijících druhů tím důvodem zřejmě bylo zmírnění rizik, která těhotenství a porod ve vyšším věku představují. Je tím totiž život matky, a tím pádem i jejích již narozených potomků, ohrožen (Keefe, 1998).

Ještě do 20. století například byla úmrtnost při porodu u matek starších 40 let desetkrát vyšší u matek mladších 20 let. Právě kvůli takto vysoké úmrtnosti starších matek u porodu se zvyšovala rizika, že po sobě matka zanechá čerstvě narozené dítě, případně i dříve narozené potomky. Aby se tomu předešlo, došlo k upozadění individuálního reprodukčního úspěchu žen tak, aby ve vyšším věku neinvestovala energii do dalšího těhotenství, ale starala se o již narozené potomky, vychovávala je a chránila je (Keefe, 1998).



Navíc reprodukční stárnutí a ztráta schopnosti se rozmnožovat nefiguruje pouze u žen západní společnosti, ale také u žen tradičních kultur nebo samic dlouho žijících druhů savců ať už v zajetí nebo volné přírodě (Keefe, 1998).

### 5.3 Pokles účinnosti DNA reparace

#### 5.3.1 Narůstající množství DNA poškození

V průběhu života jsou vznikající DSBs v oocytech opravovány reparačními mechanismy (viz kapitola 3.1). Jak ale organismus stárne, dochází k hromadění DSBs, protože klesá schopnost organismu tyto zlomy opravovat. Správné fungování oocyty proto selhává v tom, že není schopen vypořádat se se vzniklými poškozeními a následuje aktivace dráhy apoptózy (D. Zhang et al., 2015; Delabaere et al., 2017).

V experimentu, který potvrzuje, že v oocytech starších samic najdeme více DSBs než v těch mladých, byly použity primordiální folikuly myši – starých 4-5 týdnů (označeny jako mladé) a 11-12 měsíců (označeny jako staré). Myši ve věku okolo 11-12 měsíců stářím zhruba odpovídají ženám po 30. roku života. Po vizualizaci histonu  $\gamma$ -H2AX bylo naměřeno jeho množství ve folikulech mladých myši ve třetině případů (32,6 %), zatímco u starých myši bylo  $\gamma$ -H2AX-pozitivních 58,5 % folikulů. Stejného závěru bylo dosaženo při porovnání oocytů z IVF od žen ve věkovém rozpětí 24-41 let (Titus et al., 2013).

Podobného výsledku bylo rovněž dosaženo při určování množství  $\gamma$ -H2AX foci v kumulárních buňkách. Byly porovnávány pacientky mladé a staré (průměrný věk – cca 26,2 a 41,6 roku). Bylo zjištěno, že podíl  $\gamma$ -H2AX-pozitivních buněk se s vzrůstajícím věkem zvyšuje – konkrétně 12,4 % u mladých žen vs. 24,3 % u starších žen. Výsledky dále ukazují, že kumulární buňky starších žen podstupovaly s větší frekvencí časnou apoptózu než kumulární buňky mladých žen (Sun et al., 2018).

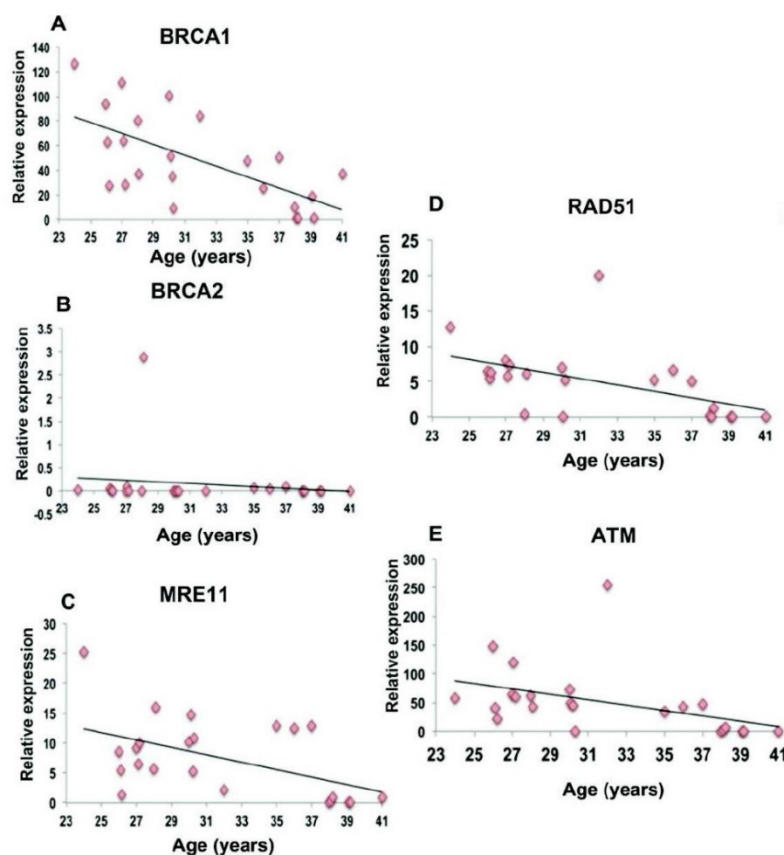
Při výzkumu prováděném na makakovi rhesus (*Macaca mullata*) byl kvantifikován nejen výskyt DNA poškození v oocytech, ale také počet samotných folikulů. Primordiálních, primárních i sekundárních folikulů s přibývajícím věkem ubývalo – u nejstarších jedinců (18-19 let) se vyskytovalo jen pár folikulů, z čehož téměř žádný antrální. Množství DNA poškození koreluje s předchozími experimenty – počet DSBs s věkem makaka vzrůstá (D. Zhang et al., 2015).

#### 5.3.2 Snížení exprese reparačních a dalších genů

Zásadním důvodem, proč dochází k hromadění DSBs a snížené schopnosti zlomy opravovat, je pokles v expresi DNA reparačních genů (Govindaraj et al., 2015). Proteiny, které jsou kódovány těmito geny, se účastní oprav DNA. U oocytů z IVF ve výše zmíněném experimentu byla dále kvantitativně stanovena exprese genů, které jsou klíčové pro reparaci DNA poškození, tj. *brca1*, *brca2*, *atm*, *mre11*,



rad51. Jediný gen brca2 nevykazoval, na rozdíl od ostatních, statisticky signifikantní pokles exprese vzhledem ke zvyšujícímu se věku (obr. 12). Toto zjištění svědčí o významnosti DNA reparací během reprodukčního stárnutí (Titus et al., 2013).



Obr. 12: Expresa genů účastnících se reparace DNA. Převzato z (Titus et al., 2013)

Vaječníky odebrané z makaka rhesus byly dále použity ke zjištění množství BRCA1 v oocytech a granulózních buňkách. U opic mladých (3-4 roky) i středně starých (7-8 let) granulózní buňky vykazovaly vysoký počet BRCA1 foci – konkrétně 23,8 a 22,9, zatímco u nejstarších jedinců (18-19 let) došlo k redukci na počet 9,8 (D. Zhang et al., 2015).

Ve studii používající krysí primordiální folikuly byla provedena analýza genové exprese. Opět byly uvažovány dvě skupiny folikulů – z mladých (staré 18-20 dní) a starých krys (staré 400-450 dní). Výsledky analýzy ukázaly, že geny související se zásadními buněčnými funkcemi, např. buněčný cyklus, meiotické dělení, stabilita chromosomů, DNA replikace a DNA reparace, jsou věkem ovlivňovány. Např. exprese genu pro protein FIGL1, účastnící se opravy DSBs skrze HR, byla ve folikulech starých krys signifikantně snížena. K tomu samému došlo u genu kódující protein REC8, klíčový v kontrole segregace chromosomů, nebo u genu kódující transkripční faktor PTX3, důležitý pro úspěšnou fertilizaci (Govindaraj et al., 2017).

Podobná analýza genové exprese byla provedena také na lidských oocytech, rovněž rozdělených do dvou skupin – mladé (ženy mladší 35 let) a staré (37-39 let). Opět byly nalezeny věkem ovlivněné geny kódující proteiny, zapojené do udržování stability DNA, regulace tvorby dělicího vřeténka nebo segregace chromosomů. Např. snížená exprese genu kódující protein MTFR1, důležitého v odpovědi na oxidativní poškození, může vést k nižší kapacitě oocyту čelit a odolávat oxidativnímu stresu. Existují také ale geny, jejichž exprese se s přibývajícím věkem naopak zvýšila. Příkladem je např. gen pro MAD2L1. Jeho zvýšená exprese může způsobovat umlčování SAC, čímž je zvětšeno riziko nekorektní segregace chromosomů (Grøndahl et al., 2010).

## Závěr

Hlavním cílem bakalářské práce bylo popsat vznikající DNA poškození v oocytech a jaký je vztah mezi vzniklými poškozeními a věkem ženy. Je bezesporu jasné, že věk ženy hraje klíčovou roli pro úspěšné pokusy o otěhotnění.

Oocyty se musí v průběhu života potýkat s endogenními i exogenními vlivy, které způsobují vznik DNA poškození. Musí proto disponovat reparačními mechanismy, které poškození opravují. Oocyty savců jsou navíc poměrně citlivé na poškození, zvláště pokud vezmeme v úvahu efekt dlouhověkosti. Vztaženo vzhledem k člověku, mohou některé z oocytů zůstat ve vaječníku i více než 40 let. Až poté klidně může dojít ke stimulu znovuzahájení meiózy a nabytí schopnosti stát se oplozením schopným. Rozpoznání DNA poškození proto musí být efektivní, aby ve vaječníku zůstalo dostatečné množství kvalitních oocytů, které mohou být oplozeny spermií a dát vzniknout životaschopnému embryu.

Se zvyšujícím se věkem ženy ale dochází k nárůstu množství vzniklých DNA poškození. V práci byly diskutovány experimenty, které nárůst poškození – konkrétně množství dvouřetězcových zlomů – potvrzují, a to nejen na myším modelu, ale také na modelu makaka nebo člověka.

Společně s nárůstem DNA poškození ale dochází k poklesu exprese reparačních genů. Proteiny, které jsou těmito geny kódovány, jsou součástí reparačních procesů a účastní se oprav poškozených úseků DNA. Jak žena stárne, hromadí se v oocytech DNA poškození, která by byla za běžné situace opravena. V tomto případě ale nemůže být reparace jednotlivých DNA poškození efektivní a robustní natolik, aby došlo k řádné opravě všech poškození. To opět potvrzují experimenty v práci popsané – např. stanovená genová exprese reparačních genů – *brca1*, *atm*, *mre11* nebo *rad51*.

Výsledný nárůst DNA poškození je proto kombinací dvou efektů, a to konkrétně zvýšené množství DNA poškození se zvyšujícím se věkem ženy a snižující se reparační schopnost oocyty.

Problémem však nejsou jen DNA poškození, která se hromadí v oocyty, ale zejména to, když jsou tato poškození následně přenesena do zygoty, respektive do embrya. To totiž čerpá z maternálních zásob a problémem právě je, když jsou tyto zásoby zmenšené vlivem snížené genové exprese.

Bakalářská práce se primárně zabývala tím, jak je věk ženy klíčový pro kvalitu oocytů a množství DNA poškození. Do budoucna se chce autorka v diplomové práci zaměřit na kvalitu oocytů ve vztahu s hormonální stimulací rovněž ve spojení s věkem a zodpovědět si otázku, jestli hormonální stimulace sama o sobě vede k nárůstu DNA poškození a zda je tento nárůst umocněn věkem. Tento jev by měl mimikovat situaci, kdy jsou ženám, jež podstupují umělé oplodnění, podávány hormony pro stimulaci vaječníků.

## Seznam zkratek

|              |   |
|--------------|---|
| 53BP1        | tumor suppressor p53-binding protein 1                                      |
| 8-oxoG       | 8-oxo-7,8-dihydroguanine  |
| alt-NHEJ     | alternative non-homologous end joining                                      |
| AP           | apurinic/apyrimidinic   |
| ATM          | ataxia telangiectasia mutated   |
| ATP          | adenosine triphosphate  |
| ATR          | ataxia telangiectasia and Rad3-related                                      |
| APC/C        | anaphase-promoting complex/cyclosome  |
| BAK          | BCL2 antagonist/killer 1  |
| BARD1        | BRCA 1 associated RING domain 1   |
| BAX          | BCL2 associated X   |
| BCL2         | B-cell lymphoma 2   |
| BER          | base excision repair  |
| BMP15        | bone morphogenetic protein 15   |
| BRCA1        | breast cancer 1   |
| BRCA2        | breast cancer 2   |
| BUB          | budding uninhibited by benomyl  |
| cAMP         | cyclic adenosine monophosphate  |
| CDC          | cell division cycle   |
| CDK          | cyclin-dependent kinase   |
| cGMP         | cyclic guanosine monophosphate  |
| CtIP         | CtBP-interacting protein  |
| DNA          | deoxyribonucleic acid   |
| DNA-PK       | DNA-dependent protein kinase  |
| DNA-PKcs     | DNA-dependent protein kinase – catalytic subunit                            |
| DSB          | double strand break   |
| dsDNA        | double strand DNA   |
| FIGNL1       | fidgetin like 1   |
| FSH          | follicle-stimulating hormone  |
| GDF9         | growth differentiation factor 9   |
| GV           | germinal vesicle  |
| GVBD         | germinal vesicle breakdown  |
| HR           | homologous recombination  |
| CHK1,2       | checkpoint kinase 1,2   |
| Ku70 (XRCC6) | X-ray repair cross complementing 6  |
| Ku80 (XRCC5) | X-ray repair cross complementing 5  |
| LH           | luteinizing hormone   |
| MAD          | mitotic arrest deficient  |
| MAD2L1       | mitotic arrest defective protein 2  |
| MDC1         | mediator of DNA damage checkpoint 1   |
| MMR          | mismatch repair   |
| MPF          | maturation/mitosis promoting factor   |
| MRE11        | meiotic recombination 11  |
| MRN          | MRE11, RAD50, NBS1 complex  |
| MTFR1        | mitochondrial fission regulator 1   |
| MYT1         | membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase |
| NBS1         | Nijmegen breakage syndrome 1  |
| NCS          | neocarzinostatin  |
| NER          | nucleotide excision repair  |

|              |   |
|--------------|---|
| NHEJ         | non-homologous end joining                        |
| NOXA (PMAP1) | phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 |
| OGG1         | 8-oxoguanine DNA glycosylase                      |
| PALB2        | partner and localizer of BRCA2                    |
| PDE3A        | phosphodiesterase 3A                              |
| PIKK         | phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase      |
| PKA          | protein kinase A                                  |
| PTX3         | pentraxin-related protein 3                       |
| PUMA         | p53 upregulated modulator of apoptosis            |
| RAD51        | RAD51 recombinase                                 |
| REC8         | meiotic recombination protein 8                   |
| ROS          | reactive oxygen species                           |
| RPA          | replication protein A                             |
| SAC          | spindle assembly checkpoint                       |
| SSB          | single strand break                               |
| ssDNA        | single strand DNA                                 |
| TGFβ         | transforming growth factor β                      |
| XRCC4        | X-ray repair cross complementing 4                |

## Seznam použité literatury

- Ahmadi, A., & Ng, S. C. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *The Journal of Experimental Zoology*, 284(6), 696–704.
- Ahmed, E. A., Scherthan, H., & de Rooij, D. G. (2015). DNA double strand break response and limited repair capacity in mouse elongated spermatids. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29923–29935.
- Alfieri, C., Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., Maslen, S., Skehel, M., & Barford, D. (2016). Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature*, 536(7617), 431–436.
- Anderson, E., & Albertini, D. F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of Cell Biology*, 71(2), 680–686.
- Araújo, S. J., & Kuraoka, I. (2019). Nucleotide excision repair genes shaping embryonic development. *Open Biology*, 9(10), 190166.
- Bailey, S. M., Meyne, J., Chen, D. J., Kurimasa, A., Li, G. C., Lehnert, B. E., & Goodwin, E. H. (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 14899–14904.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S.-Y., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., & Ziv, Y. (1998). Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science*, 281(5383), 1674–1677.
- Barbosa, J., Nascimento, A. V., Faria, J., Silva, P., & Bousbaa, H. (2011). The spindle assembly checkpoint: Perspectives in tumorigenesis and cancer therapy. *Frontiers in Biology*, 6(2), 147–155.
- Bartek, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 238–245.
- Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., & Pagano, M. (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 Axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell*, 134(2), 256–267.
- Benedict, B., van Harn, T., Dekker, M., Hermesen, S., Kucukosmanoglu, A., Pieters, W., Delzenne-Goette, E., Dorsman, J. C., Petermann, E., Foijer, F., & te Riele, H. (2018). Loss of p53 suppresses replication-stress-induced DNA breakage in G1/S checkpoint deficient cells. *ELife*, 7.
- Bolcun-Filas, E., Rinaldi, V. D., White, M. E., & Schimenti, J. C. (2014). Reversal of female infertility by Chk2 ablation reveals the oocyte DNA damage checkpoint pathway. *Science*, 343(6170), 533–536.
- Braw-Tal, R. (2002). The initiation of follicle growth: The oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 11–18.
- Braw-Tal, R., & Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1), 165–171.
- Brunet, S., & Maro, B. (2005). Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: Integrating time and space. *Reproduction*, 130(6), 801–811.
- Buccione, R., Schroeder, A. C., & Eppig, J. J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, 43(4), 543–547.
- Carroll, J., & Marangos, P. (2013). The DNA damage response in mammalian oocytes. *Frontiers in Genetics*, 4(JUN), 1–9.
- Carter, R. J., & Parsons, J. L. (2016). Base excision repair, a pathway regulated by posttranslational modifications. *Molecular and Cellular Biology*, 36(10), 1426–1437.
- Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., & Beconi, M. (2002). Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*, 124(5), 675–681.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell*, 47(4), 497–510.

- Collins, J. K., Lane, S. I. R., Merriman, J. A., & Jones, K. T. (2015). DNA damage induces a meiotic arrest in mouse oocytes mediated by the spindle assembly checkpoint. *Nature Communications*, 6(8553).
- Delabaere, L., Ertl, H. A., Massey, D. J., Hofley, C. M., Sohail, F., Bienenstock, E. J., Sebastian, H., Chiolo, I., & LaRocque, J. R. (2017). Aging impairs double-strand break repair by homologous recombination in *Drosophila* germ cells. *Aging Cell*, 16(2), 320–328.
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600), 531–535.
- Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Reports*, 4(7), 671–677.
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829–838.
- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., & Pendola, F. L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2890–2894.
- Fair, T., Hyttel, P., & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, 42(4), 437–442.
- Falck, J., Coates, J., & Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434(7033), 605–611.
- Fulton, N., Martins Da Silva, S. J., Bayne, R. A. L., & Anderson, R. A. (2005). Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(8), 4664–4670.
- García-Rodríguez, A., Gosálvez, J., Agarwal, A., Roy, R., & Johnston, S. (2018). DNA damage and repair in human reproductive cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1).
- Genescà, A., Caballín, M. R., Miró, R., Benet, J., Germà, J. R., & Egozcue, J. (1992). Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human Genetics*, 89(2), 181–186.
- Gill, M. E., Hu, Y. C., Lin, Y., & Page, D. C. (2011). Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7443–7448.
- Ginsburg, M., Snow, M. H., & McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110(1), 521–528.
- Gong, F., & Miller, K. M. (2013). Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Mutation Research*, 750(1–2), 23–30.
- Govindaraj, V., Keralapura Basavaraju, R., & Rao, A. J. (2015). Changes in the expression of DNA double strand break repair genes in primordial follicles from immature and aged rats. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(3), 303–310.
- Govindaraj, V., Krishnagiri, H., Chakraborty, P., Vasudevan, M., & Rao, A. J. (2017). Age-related changes in gene expression patterns of immature and aged rat primordial follicles. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(1), 37–48.
- Grøndahl, M. L., Yding Andersen, C., Bogstad, J., Nielsen, F. C., Meinertz, H., & Borup, R. (2010). Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Human Reproduction*, 25(4), 957–968.
- Hajkova, P., Jeffries, S. J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S. P., & Surani, M. A. (2010). Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*, 329(5987), 78–82.
- Hansen, K. R., Knowlton, N. S., Thyer, A. C., Charleston, J. S., Soules, M. R., & Klein, N. A. (2008). A new model of reproductive aging: The decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Human Reproduction*, 23(3), 699–708.
- Hartlerode, A., & Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *The Biochemical Journal*, 423(2), 157–168.

- Horta, F., Catt, S., Ramachandran, P., & Vollenhoven, B. (2020). Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Human Reproduction*, 1–16.
- Jones, A. S. K., & Shikanov, A. (2019). Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *Journal of Biological Engineering*, 13(1), 1–12.
- Kakarougkas, A., & Jeggo, P. A. (2014). DNA DSB repair pathway choice: An orchestrated handover mechanism. *British Journal of Radiology*, 87(1035), 20130685.
- Keefe, D. L. (1998). Reproductive aging is an evolutionarily programmed strategy that no longer provides adaptive value. *Fertility and Sterility*, 70(2), 204–206.
- Kerr, J. B., Hutt, K. J., Michalak, E. M., Cook, M., Vandenberg, C. J., Liew, S. H., Bouillet, P., Mills, A., Scott, C. L., Findlay, J. K., & Strasser, A. (2012). DNA damage-induced primordial follicle oocyte apoptosis and loss of fertility require TAp63-mediated induction of Puma and Noxa. *Molecular Cell*, 48(3), 343–352.
- Koert, E., & Daniluk, J. C. (2017). When time runs out: reconciling permanent childlessness after delayed childbearing. *Journal of Reproductive and Infant Psychology*, 35(4), 342–352.
- Ladstätter, S., & Tachibana-Konwalski, K. (2016). A surveillance mechanism ensures repair of DNA lesions during zygotic reprogramming. *Cell*, 167(7), 1774–1787.
- Leem, J., Bai, G. Y., Kim, J. S., & Oh, J. S. (2019). Melatonin protects mouse oocytes from DNA damage by enhancing nonhomologous end-joining repair. *Journal of Pineal Research*, 67(4), 1–11.
- Leridon, H. (2004). Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Human Reproduction*, 19(7), 1548–1553.
- Liu, D., Keijzers, G., & Rasmussen, L. J. (2017). DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research*, 773, 174–187.
- Livera, G., Petre-Lazar, B., Guerin, M. J., Trautmann, E., Coffigny, H., & Habert, R. (2008). p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis. *Reproduction*, 135(1), 3–12.
- Ma, J. Y., Feng, X., Tian, X. Y., Chen, L. N., Fan, X. Y., Guo, L., Li, S., Yin, S., Luo, S. M., & Ou, X. H. (2019). The repair of endo/exogenous DNA double-strand breaks and its effects on meiotic chromosome segregation in oocytes. *Human Molecular Genetics*, 28(20), 3422–3430.
- Ma, X., Dong, Y., Matzuk, M. M., & Rajendra Kumar, T. (2004). Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17294–17299.
- Mahaney, B. L., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical Journal*, 417(3), 639–650.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuåsen, R. G., Welcker, M., Bartek, J., & Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, 288(5470), 1425–1429.
- Marangos, P., Stevense, M., Niaka, K., Lagoudaki, M., Nabti, I., Jessberger, R., & Carroll, J. (2015). DNA damage-induced metaphase I arrest is mediated by the spindle assembly checkpoint and maternal age. *Nature Communications*, 6(8706).
- Martin, J. H., Aitken, R. J., Bromfield, E. G., & Nixon, B. (2019). DNA damage and repair in the female germline: Contributions to ART. *Human Reproduction Update*, 25(2), 1–22.
- Masciarelli, S., Horner, K., Liu, C., Park, S. H., Hinckley, M., Hockman, S., Nedachi, T., Jin, C., Conti, M., & Manganiello, V. (2004). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(2), 196–205.
- Mayer, A., Baran, V., Sakakibara, Y., Brzakova, A., Ferencova, I., Motlik, J., Kitajima, T. S., Schultz, R. M., & Solc, P. (2016). DNA damage response during mouse oocyte maturation. *Cell Cycle*, 15(4), 546–558.



- Ménézo, Y., Dale, B., & Cohen, M. (2010). DNA damage and repair in human oocytes and embryos. *Zygote*, 18(4), 357–365.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., & Murray, D. (2012). New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Munakata, Y., Kawahara-Miki, R., Shiratsuki, S., Tasaki, H., Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2016). Gene expression patterns in granulosa cells and oocytes at various stages of follicle development as well as in in vitro grown oocyte-and-granulosa cell complexes. *The Journal of Reproduction and Development*, 62(4), 359–366.
- Myers, M., Morgan, F. H., Liew, S. H., Zerafa, N., Gamage, T. U., Sarraj, M., Cook, M., Kapic, I., Sutherland, A., Scott, C. L., Strasser, A., Findlay, J. K., Kerr, J. B., & Hutt, K. J. (2014). PUMA regulates germ cell loss and primordial follicle endowment in mice. *Reproduction*, 148(2), 211–219.
- Niault, T., Hached, K., Sotillo, R., Sorger, P. K., Maro, B., Benezra, R., & Wassmann, K. (2007). Changing Mad2 levels affects chromosome segregation and spindle assembly checkpoint control in female mouse meiosis I. *PLoS ONE*, 2(11).
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136(11), 1869–1878.
- Nospikel, T. (2007). DNA repair in differentiated cells: Some new answers to old questions. *Neuroscience*, 145(4), 1213–1221.
- Nybo Andersen, A. M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., & Melbye, M. (2000). Maternal age and fetal loss: Population based register linkage study. *British Medical Journal*, 320(7251), 1708–1712.
- Ochs, F., Somyajit, K., Altmeyer, M., Rask, M. B., Lukas, J., & Lukas, C. (2016). 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair. *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(8), 714–721.
- Ozturk, S., & Demir, N. (2011). DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histology and Histopathology*, 26(4), 505–517.
- Pannunzio, N. R., Watanabe, G., & Lieber, M. R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10512–10523.
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, 125(17), 3323–3328.
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*, 234(2), 339–351.
- Pincus, G., & Enzmann, E. V. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *The Journal of Experimental Medicine*, 62(5), 665–675.
- Pirino, G., Wesco, M. P., & Donovan, P. J. (2009). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*, 8(4), 665–670.
- Potapova, T. A., Daum, J. R., Byrd, K. S., & Gorbsky, G. J. (2009). Fine tuning the cell cycle: Activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Molecular Biology of the Cell*, 20(6), 1737–1748.
- Rocha, S., Martin, A. M., Meek, D. W., & Perkins, N. D. (2003). p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(13), 4713–4727.
- Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L. K., Plancha, C. E., & Albertini, D. F. (2008). Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *Journal of Cellular Physiology*, 216(2), 355–365.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H., Löbrich, M., & Biophysik, F. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5706–5715.
- Shibata, A. (2017). Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutation Research*, 803–805, 51–55.

- Solc, P., Schultz, R. M., & Motlik, J. (2010). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: Comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Molecular Human Reproduction*, 16(9), 654–664.
- Suh, E. K., Yang, A., Kettenbach, A., Bamberger, C., Michaelis, A. H., Zhu, Z., Elvin, J. A., Bronson, R. T., Crum, C. P., & McKeon, F. (2006). p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature*, 444(7119), 624–628.
- Sun, X. lei, Jiang, H., Han, D. xu, Fu, Y., Liu, J. bo, Gao, Y., Hu, S. min, Yuan, B., & Zhang, J. bao. (2018). The activated DNA double-strand break repair pathway in cumulus cells from aging patients may be used as a convincing predictor of poor outcomes after in vitro fertilization-embryo transfer treatment. *PLoS ONE*, 13(9).
- Tahajjodi, S. S., Yazd, E. F., Agha-Rahimi, A., Aflatoonian, R., Khalili, M. A., Mohammadi, M., & Aflatoonian, B. (2020). Biological and physiological characteristics of human cumulus cells in adherent culture condition. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 18(1), 1–10.
- Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K. I., Van Gent, D. C., Shiraishi, T., Verkaik, N. S., VanHeems, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Matsuura, S., & Komatsu, K. (2002). Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, 420(6911), 93–98.
- Tease, C. (1983). X-ray-induced chromosome aberrations in dictyate oocytes of young and old female mice. *Mutation Research*, 119(2), 191–194.
- Titus, S., Li, F., Stobezki, R., Akula, K., Unsal, E., Jeong, K., Dickler, M., Robson, M., Moy, F., Goswami, S., & Oktay, K. (2013). Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Science Translational Medicine*, 5(172).
- Van Gent, D. C., & Van Der Burg, M. (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*, 26(56), 7731–7740.
- Vilenchik, M. M., & Knudson, A. G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Genetics*, 100(22), 12871–12876.
- Wassmann, K., Nialt, T., & Maro, B. (2003). Metaphase I arrest upon activation of the Mad2-dependent spindle checkpoint in mouse oocyte. *Current Biology*, 13(18), 1596–1608.
- Wear, H. M., McPike, M. J., & Watanabe, K. H. (2016). From primordial germ cells to primordial follicles: A review and visual representation of early ovarian development in mice. *Journal of Ovarian Research*, 9(1).
- Winship, A. L., Stringer, J. M., Liew, S. H., & Hutt, K. J. (2018). The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. *Human Reproduction Update*, 24(2), 119–134.
- Wood, R. D. (1999). DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie*, 81(1–2), 39–44.
- Wyck, S., Herrera, C., Requena, C. E., Bittner, L., Hajkova, P., Bollwein, H., & Santoro, R. (2018). Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. *Epigenetics and Chromatin*, 11(1), 60.
- Zeng, F., Baldwin, D. A., & Schultz, R. M. (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Developmental Biology*, 272(2), 483–496.
- Zhang, D., Zhang, X., Zeng, M., Yuan, J., Liu, M., Yin, Y., Wu, X., Keefe, D. L., & Liu, L. (2015). Increased DNA damage and repair deficiency in granulosa cells are associated with ovarian aging in rhesus monkey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(7), 1069–1078.
- Zhang, Z., Zhu, L., Lin, D., Chen, F., Chen, D. J., & Chen, Y. (2001). The three-dimensional structure of the C-terminal DNA-binding domain of human Ku70. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38231–38236.